



**Karen Rayane
Medeiros da Silva** **Efeitos do hipoclorito de sódio na tiroide e gónadas de
*Danio rerio***

**Effects of sodium hypochlorite on thyroid and gonads of
*Danio rerio***



Karen Rayane **Efeitos do hipoclorito de sódio na tiroide e gónadas de**
Medeiros da Silva ***Danio rerio***

Effects of sodium hypochlorite on thyroid and gonads of
Danio rerio

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Inês Borralho Domingues, investigadora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Doutor António José Arsénia Nogueira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Júri

Presidente

Professor Doutor João António de Almeida Serôdio
Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutora Paula Inês Borralho Domingues
Investigadora de Pós Doutoramento do CESAM

Coorientador

Professor Doutor António José Arsénia Nogueira
Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Marta Sofia Soares Craveiro Alves Monteiro dos Santos
Investigadora de Pós Doutoramento do CESAM

Agradecimentos

A minha orientadora Doutora Inês Domingues, pela disponibilidade, paciência, e simpatia, opiniões, sugestões, pela revisão crítica do texto, e pelos profícuos comentários.

Ao meu coorientador Professor Doutor António Nogueira, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, partilha do saber, paciência, pelos esclarecimentos, pelos oportunos conselhos, pela acessibilidade, pela simpatia, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que, por vezes, tornaram-se decisivos em determinados momentos da elaboração desta tese, pelo interesse evidenciado, incluindo o benéfico acompanhamento ao longo do meu percurso académico. O meu mais profundo agradecimento pelo contributo imprescindível na realização desta dissertação;

Ao Professor Doutor Amadeu Soares pela atenção prestada ao meu trabalho, a minha eterna gratidão; A Professora Doutora Maria de Lourdes pela simpatia e por ter cedido meu local de trabalho; A Doutora Mônica Moura pelo incentivo e amizade;

Aos colegas do laboratório Rita Bicho e Rhaul Oliveira, por tudo que me ensinaram, foi de suma importância em âmbito pessoal e profissional e pela cooperação em diversos momentos da realização do trabalho;

Aos meus queridos amigos Luís Martins, Elton Lima, Liliana Santos, Diogo, Madu, Risy, Jhonny, Alexandra, Marta, Solange, Sara, Mariana, Marcela, Henrique Tajiri, Felipe Oliveira, Marlova, Marx, Andréia Fonseca, Kaline, Aline Werber e Nelson pela amizade, apoio e preocupação com a brasuca; Suzana Silva pelo apoio aos momentos mais difíceis da minha vida, e por demonstrar que amigos verdadeiros são para todas as horas, Tayan Lima que do Amazonas me tirava sorrisos, pela força e incentivo. Um agradecimento especial a minha querida amiga Karina Cal, pela amizade e paciência para conversar e entender meus dias de saudade da família, pelos sorrisos, e principalmente por acompanhar meu trabalho em Portugal e no Brasil e estar sempre presente com palavras de incentivo, tu és meu exemplo de amizade; a todos os amigos da família do bloco 8 e estudantes de mobilidade de todo o Brasil. Sem vocês tudo seria mais difícil.

À minha família pelo apoio, incentivo, por acreditarem e por fazerem tudo por mim.

Aos mestres da minha vida meus pais Elzilene e Edmar, que entre risos e choros de saudade e diante das inúmeras dificuldades, fizeram o possível e quase o impossível para que eu pudesse continuar meus estudos a quem dedico esta dissertação, e, por último e não menos importante a minha avó Lêda Medeiros (in memoriam), a minha determinação e força provém de ti.

Palavras-chave Hipoclorito de Sódio, *Danio rerio*, histologia, tiroide, gónadas.

Resumo

O hipoclorito de Sódio (HS) é um desinfetante produzido a partir do cloro que possui propriedades oxidantes, e tem inúmeras aplicações, tais como desinfecção de água potável, limpeza doméstica, tratamento de efluentes industriais, branqueamento de polpa de celulose e têxteis, desinfecção hospitalar, lavagem de frutas e verduras, além da participação, como intermediário, na produção de químicos diversos. Quando em contato com a matéria orgânica presente nas águas residuais forma compostos organoclorados. Esse produto químico permanece no ecossistema podendo causar danos nos organismos aquáticos. Alguns estudos indicam que o HS pode ser um disruptor endócrino para organismos aquáticos; assim este trabalho visa estudar os efeitos do HS na histologia da tiroide e gónadas de peixe (*D. rerio*). Os peixes foram expostos a várias concentrações de HS por 14 dias. Após esse período, os animais foram transferidos para meio sem químico por mais 7 dias para avaliar a sua eventual recuperação. Foram utilizadas as técnicas de coloração de Cleveland-Wolf (CW) e de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscopia de luz; na tiroide foi avaliado a altura dos tirócitos e a área dos folículos; nos testículos avaliou-se a área do lúmen, o diâmetro do túbulo e altura da franja; e nos ovários foram quantificadas as células pertencentes aos vários estádios de maturação.

Não se observaram alterações de área das células da tiroide durante o período de estudo apesar de se ter verificado uma redução significativa da altura das células no dia 21 nas concentrações mais elevadas (50 e 500 µg/l HS). Não se observaram diferenças significativas ao nível das células das gónadas masculinas. As fêmeas apresentaram atraso nos estádios de desenvolvimento com o aumento da concentração de HS.

Concluimos que o HS comporta-se como um disruptor endócrino causando efeitos na tiroide e gónadas de *D. rerio*, podendo comprometer vários processos fisiológicos incluindo o desenvolvimento e o sucesso reprodutivo da espécie. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os diferentes mecanismos de ação do HS nas diversas glândulas e a relação entre os efeitos histológicos e efeitos a nível populacional. Este trabalho contribui para salientar a importância da regulamentação e restrição do uso de desinfetantes como o HS, que ao entrarem em contato com corpos de água sem tratamento prévio adequado, podem acarretar efeitos deletérios nos organismos aquáticos pondo em causa o equilíbrio de todo o ecossistema.

Keywords: Sodium hypochlorite, *D. rerio*, histology, thyroid, gonads.

Abstract

The Sodium Hypochlorite (HS) is a disinfectant produced from chlorine, it has oxidant properties and has numerous applications, such as disinfection of drinking water, household cleaning, industrial wastewater treatment, pulp and textiles bleaching, hospital disinfection, washing fruits and vegetables, as well as participation as an intermediary in the production of various chemicals. When in contact with organic matter present in wastewater forms organochlorine compounds. This chemical remains in the ecosystem and may cause damage to aquatic organisms. Several studies indicate that SH may act as an endocrine disruptor. Thus, in this study the effects of SH were assessed in the thyroid and gonads of fish (*D. rerio*). Fish were exposed to SH at concentrations of 0, 5, 50, 500 µg / L for 14 days. After this period, the animals were transferred to clean medium for further 7 days and allowed to recover. At days 3, 7, 14 and 21 organisms were sampled for gonads and thyroid histological analysis. The staining techniques of Cleveland-Wolf (CW) and hematoxylin and eosin (HE) were used. Light microscopy was used to measure several cell parameters: thyrocytes (height and area), seminiferous tubules (area, diameter and height of the fringe) and maturation stages of ovarian cells.

No significant changes in area of thyrocytes were observed during the exposure period, although a reduction of cell height was recorded at the highest concentration (50 and 500 µg/l of HS) at day 21. There were no significant differences in male gonad cells. Females ovarian cell showed delay in developmental stages between treatments with increasing HS concentration.

HS behaves as an endocrine disrupting compound, causing changes in thyroid structure and female gonads development of *D. rerio*, which can compromise several physiological processes including development and reproductive success. More research is needed to elucidate the modes of action of HS in the different glands, and the relation between histological and population level effects. This work highlights the importance of regulation and restrictions on the use of disinfectants, such as HS, especially when they enter aquatic systems without proper treatment, as they might cause strong deleterious effects on aquatic organisms compromising the entire ecosystem.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Cloro: breve revisão	4
1.1.1. <i>Hipoclorito de Sódio (NaOCl)</i>	5
1.1.2. <i>Impacto ambiental</i>	6
1.2. Sistema Endócrino	7
1.2.1. <i>Glândula Tiroide</i>	8
1.2.2. <i>Eixo Hipotálamo – Pituitária – Tiroide</i>	9
1.2.3. <i>Hormonas Tiroideas</i>	11
1.2.4. <i>Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas</i>	15
1.3. Espécie modelo utilizada no estudo	17
1.3.1. <i>Caracterização das gónadas masculinas</i>	19
1.3.2. <i>- Caracterização das gónadas femininas</i>	21
2. Material e Métodos	23
2.1. Organismos teste	23
2.2. Teste com HS: procedimento experimental.....	23
2.3. Preparação histológica e análise morfológica.....	24
2.3.1. <i>Tiroide</i>	26
2.3.2. <i>Gónadas masculinas</i>	27
2.3.3. <i>Gónadas femininas</i>	28
2.4. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS	30
3.1. Tiroide.....	30
3.2. Gónadas masculinas	34
3.3. Gónadas femininas.....	35
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS	43

Lista de figuras

Figura 1 - Reação do cloro e hidróxido de sódio para produzir HS (adaptado de http://www.omegachem.com.au/docs/mega_handbook.pdf)	5
Figura 2 - Anatomia normal e histologia do folículo da tiroide no <i>D. rerio</i> , aorta ventral (c), folículos (f) (segundo Menke, 2011).....	9
Figura 3 - Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide.	10
Figura 4 - A imagem representa as etapas da síntese das hormonas da tiroide (segundo www.uta.edu/biology).	12
Figura 5 - Estruturas moleculares das hormonas da tiroide (segundo www.uta.edu/biology).	14
Figura 6 - Etapas envolvidas no processo reprodutivo de teleósteos, propostas por Redding e Patiño (1993), modificada por Sato(1999).....	17
Figura 7 - Casal de <i>D. rerio</i> , macho (esquerda) notavelmente mais esguio que a fêmea (direita). Foto: “ scienceofsewing.blogspot.com ”.	18
Figura 8 -Histologia normal do testículo de <i>D. rerio</i> . (a) células de Sertoli; (b) células de Leydig; (c) espermatogónia tipo I; (d) espermatogónia tipo II; (e) espermatócito; (f) espermatócito na primeira divisão meiótica; (g) espermátide madura; (h) testículos.	20
Figura 9 - Histologia normal ovário do <i>D. rerio</i> . (a) oogónia; (b) folículo pré-vitelogénico; (c) folículo vitelo génico; (d) folículo pré-ovulatório; (e) ovário.....	22
Figura 10 - Esquema representativo de um folículo da glândula tiroide. Ilustração da medição da área total do folículo e da altura de um tirócito (segundo Rita Bicho).	27
Figura 11 - Esquema representativo da medição do túbulo seminífero. Medição da área total do lúmen do diâmetro e da altura (lado direito) da franja espermatogénica.	28
Figura 12 - Representação da contagem das células da gônada das fêmeas com a utilização de quadrantes. Observação com ampliação de 400x e coloração HeE. ...	29

Figura 13 - A figura indica a média e intervalo de confiança a 95% da medição da atividade da tiroide em <i>D. rerio</i> . Medição da altura dos tirócitos dos folículos de secções da tiroide dos indivíduos sujeitos a 0, 5, 50 500 µg/l de HS (n=20 para cada grupo controle e tratamentos). Símbolos a cheio - Período de exposição; Símbolos em branco - Período pós-exposição.....	31
Figura 14 - Foto micrografia de corte histológico do tecido da tiroide de <i>D. rerio</i> . A corte histológico do folículo de peixe controlo no dia 21; B deformação do epitélio de peixes expostos a 50 µg/l , dia 21; C corte histológico do folículo de peixe controlo no dia 21; D deformação do epitélio do folículo e aumento na altura dos tirócitos exposto a 500 µg/l no dia 21. Observação com ampliação de 400x e coloração CW.	32
Figura 15 – A figura indica a média e intervalo de confiança a 95% da medição da atividade da tiroide em <i>D. rerio</i> . Medição da área dos folículos de secções da tiroide dos indivíduos expostos a 0, 5, 50 500 µg/l de HS expostos a 14 dias com 7 d para recuperação n=20 para cada grupo controle e tratamentos. Símbolos a cheio - Período de exposição; Símbolos em branco - Período pós-exposição.	33
Figura 16 - Fotomicrográfica de um corte histológico de gónada de macho da espécie <i>D. rerio</i> do grupo controlo. Túbulo seminífero; Espermatogónia (EP), espermatócito primário (ESP), espermatócito secundário (ESS), espermátide (ESM). Observação com ampliação de 400x e coloração H.E.....	35
Figura 17- Distribuição relativa, ao longo do tempo, dos diferentes estádios de maturação das células ovocitárias em função da concentração de HS a que as fêmeas de <i>D. rerio</i> estiveram expostas.	36
Figura 18 - Fotomicrográfica de corte histológico de gónada de fêmea da espécie <i>D. rerio</i> do grupo controlo A e C, 3 dias 0 µg/l e tratados B, 21 dias 50 µg/l HS e D 21 dias (pós-exposição) 500 µg/l HS. Fases de maturação das gónadas II, III, IV e V (FII , FIII , FIV , FV , respectivamente), núcleos (N), vesículas citoplasmáticas (vs), grânulos de vitelo (gr), células foliculares (↑), membrana vitelina (★). Observação com ampliação de 100x e coloração HeE.....	37

Lista de tabelas

Tabela I- Descrição das fases da espermatogênese das células de <i>D. rerio</i> macho (segundo Johnson et al. 2009).	21
Tabela II - Descrição das fases ovogênese para fêmeas <i>D. rerio</i> (segundo Johnson et al. 2009).	23
Tabela III - ANOVA bifatorial do efeito da concentração de HS na altura e área dos tirócitos de <i>D. rerio</i> (após transformação pela raiz quadrada).	33
Tabela IV –ANOVA unifatorial para a altura e área dos túbulos seminíferos e altura da franja de machos de <i>D. rerio</i> após exposição a diferentes concentrações de NaOCl.	34
Tabela V - Comparação do efeitos dos tratamentos nos estágios de desenvolvimento dos oócitos de <i>D. rerio</i> expostos as diferentes concentrações de NaOCl. (Oo - Oogonia; On - Oócito nucleolar; Op - Oócitos perinucleolares; Oca - Oócitos cortical alveolar; Ov1 - Oócitos vitelogénicos 1; Ov2 - Oócitos vitelogénicos 2; S –significativo; NS - não significativo).	36

Lista de abreviaturas

- HS: Hipoclorito de Sódio;
- Cl₂: cloro gasoso;
- HOCl: ácido hipocloroso;
- OCl⁻: Ião Hipoclorito;
- TSH: hormona estimulante da tiroide;
- EDs: disruptores endócrinos;
- T3: triiodotironina;
- T4: tiroxina;
- HT: hormonas da tiroide;
- HPT: eixo hipotálamo-Pituitária-tiroide;
- TRH: tirotropina;
- I⁻: iodeto;
- I₂: iodo ioxidado;
- Tg: tireoglobulina;
- MIT: moniodotirosina;
- DIT: diiodotironina;
- ID: Iodotironinas desiodinases;
- IRD: L- alanina;
- rT3: T3 reversa;
- T2: diiodotironina;
- IS: Iodo de sódio;
- TTR: transtirretina;
- HHG: eixo hipotálamo-hipófise-gonadal;
- GnRH: gonadotropina;

- GHT I e II: hormonas gonadotrópicas;
- FSH: hormona estimulante;
- LH: Hormona luteinizante;
- GH: hormona de crescimento.

1. Introdução

A toxicidade de substâncias químicas é referida desde os primórdios da humanidade. A Toxicologia teve um crescimento significativo depois da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), pois ocorreu um aumento na produção de moléculas orgânicas e substâncias químicas de uso industrial (Colborn et al. 1993). Com o fim da guerra, o ocidente passou por um período de reconstrução, onde o desenvolvimento baseado no incentivo à produção era a prioridade, porém nessa época os efeitos prejudiciais desses novos compostos para a saúde humana, para os animais e para o próprio ambiente eram desconhecidos. Desde então, a utilização exagerada e sem critérios dessas novas substâncias vem comprometendo seriamente o meio ambiente (Reys 2001).

De entre alguns exemplos podemos citar o uso inadequado de alguns pesticidas organoclorados e a exposição de peixes a estrógenos com potenciais efeitos adversos sobre essas populações (Jobling et al. 1998; Rand et al. 1995). Na década de 60, a naturalista Rachel Carson com a publicação de seu famoso livro, “Silent Spring” (Primavera Silenciosa) alertava para os perigos do uso de pesticidas na agricultura, chamando a atenção para a insuficiência reprodutiva observada em aves e peixes e que provavelmente afetariam também a saúde humana (Daston et al. 2003; Markley et al. 2003).

A partir daí, os efeitos tóxicos de substâncias têm sido mais estudados, principalmente em peixes (Bilsson et al. 1998). Foi criada posteriormente uma nova área de investigação a toxicologia ambiental, dedicada ao estudo das ações e dos efeitos nocivos de substâncias químicas nos organismos. Os produtos químicos de origem natural ou antropogénica, com a capacidade para interferirem nas instruções naturais hormonais para as células, que causam alterações na função fisiológica das hormonas do sistema endócrino de animais e humanos são chamados disruptores endócrinos (USEPA 2002).

Pesticidas, nomeadamente compostos organoclorados, e alguns compostos naturais, são algumas moléculas de interesse que atuam como disruptores endócrinos. Estas substâncias podem alterar a formação e as funções dos tecidos e órgãos. Em inúmeros países, criaram-se grupos de trabalho pela proteção do meio ambiente, e.g. a Agência Ambiental Europeia (EEA) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

(USEPA), para implantarem programas de avaliação da qualidade da água e de alimentos, relativamente presença de pesticidas e outros compostos químicos com o potencial de afetar o sistema endócrino (USEPA 2002), o Programa Internacional em Segurança Química (IPCS –International Program on Chemical Safety) — cujo órgão executivo é a Organização Mundial de Saúde (OMS) —, a Organização para a Cooperação no Desenvolvimento e Economia (OCDE) e o Comité Científico para Toxicologia, Ecotoxicologia e Ambiente (SCTEE – Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment) da Comissão Europeia (Reys 2001). Desse modo, foram criados protocolos com o objetivo de analisar a função reprodutiva, avaliando-se aspectos como o de sobrevivência, comportamento durante o acasalamento, fecundação, fertilização, concentrações hormonais sexuais e morfologia das gónadas.

São inúmeras as substâncias usadas mundialmente nas indústrias, e países como o Brasil, Estados Unidos e China apresentam elevada faturação proveniente da comercialização desses produtos (Fukushima and Azevedo 2010). Além disso, o impacto de diferentes tipos de efluentes provenientes de atividades humanas sobre várias espécies de peixes tem sido referida em várias regiões do mundo (Brambilla et al. 1993; Vos 2000) contribuindo para o aumento de efeitos tóxicos nos seres vivos, e acarretando consequências para as próximas gerações.

Um das substâncias utilizadas nas indústrias e principalmente em portos para a desinfecção de águas de tanques de navios e efluentes é o cloro. Cloro é o biocida mais utilizado em sistemas de água de refrigeração (EC 2000 ; Taylor 2006), no entanto, por causa da falta de legislação pode ser constantemente encontrado no ambiente em descargas para o meio aquático e tem sido considerado responsável por muitas mortes de peixes em ambientes marinhos e de água doce (Langford 1990). Recentemente, há uma maior preocupação com relação aos compostos clorados como os PCBs, porque existem evidências de que têm a capacidade de causar a disrupção endócrina em peixes. No caso do hipoclorito de sódio (HS), desinfetante derivado do cloro, existem apenas alguns estudos que indicam que esse composto causa hipotireoidismo em mamíferos, não existindo estudos conhecidos em peixes, com exceção de Bicho (2009). O impacto potencial do cloro descarregado por efluentes sobre a fisiologia de peixes locais ainda não está claramente entendido (Verma et al. 2007). É um composto pouco estudado e sem muitas informações não sendo considerado um disruptor endócrino, no entanto,

segundo Bicho (2009), existem evidências que mamíferos e peixes tratados com cloro apresentaram efeitos no funcionamento da tiroide.

Neste estudo foi utilizado o *D. rerio* por ser um organismo de fácil adaptação em laboratório, por ter uma reprodução contínua e pela falta de informação dos efeitos do hipoclorito na tiroide e gónadas do *D. rerio*. Esta espécie tem sido utilizada como modelo experimental em vários estudos farmacológicos e toxicológicos, tendo-se verificado em numerosos estudos que os perfis de toxicidade são semelhantes aos dos mamíferos (Berghmans et al. 2008).

As técnicas histológicas, onde os tecidos são submetidos a cortes finos, e colorações específicas, têm sido de grande importância para indicar possíveis disruptores endócrinos.

O objetivo geral deste trabalho é avaliar se o HS atua com um disruptor endócrino. Neste âmbito, *D. rerio* foi exposto a doses subletais do HS, tendo-se avaliado os efeitos na histologia da tiroide e gónadas de *D. rerio* utilizando o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico – OCDE TG 204 para teste de toxicidade crónica para peixe com 14 dias de exposição (Johnson et al. 2009). Os objetivos específicos deste trabalho serão:

1. Avaliar os efeitos do HS na tiroide e gónadas ao longo do período de exposição (3, 7 e 14 dias)
2. Avaliar se os efeitos detectados são reversíveis após um período de 7 dias de recuperação onde os peixes não estão expostos a HS.

1.1. Cloro: breve revisão

O cloro (Cl_2 , do grego $\chi\lambda\omega\rho\omicron\varsigma$ = chlorós) é um elemento químico, símbolo Cl, está situado na série química dos halogénios, onde se encontram o flúor, o brómio, o iodo e o astato (Chang 1994). Encontra-se no estado gasoso, é mais pesado que o ar, com coloração amarela esverdeada e odor irritante. É abundante na natureza, em geral sobaforma de sal (NaOCl) de onde provém. Na sua forma líquida e sólida é um poderoso agente oxidante, branqueador e desinfectante, sendo muito utilizado pelo homem. Foi descoberto em 1774 pelo sueco Carl Wilhelm Scheele, que acreditou que podia tratar-se de um composto contendo oxigénio. Os processos anteriores às técnicas de eletrólise baseavam-se nesta reação direta de HCl com o ar ou oxigénio puro, produzindo água e cloro (Fernandes et al. 2009). A primeira utilização do cloro ocorreu em 1789, com o hipoclorito de potássio usado nas indústrias têxteis para o branqueamento de tecidos. Em 1810, o químico inglês Humphrey mostrou que a substância era um elemento químico, e deu-lhe o nome de cloro. Em 1823, o cloro começou a ser utilizado para a desinfecção dos hospitais (Winder 2001).

Entre 1920 e 1940, o cloro aumentou a sua participação em muitos outros processos produtivos, com o início da produção de solventes clorados. Dos 70.000 produtos habitualmente utilizados no dia-a-dia, cerca de 10% contém cloro (Jenkins 2000; Kleijn and van der Voet 1998). O HS é um dos compostos que libertam cloro e tem ação conhecida como desinfectante de superfícies.

De entre as aplicações de cloro destacam-se: tratamento de águas residuais, branqueamento da polpa de celulose e papel reciclado, agroquímicos, principalmente defensivos agrícolas, antissépticos, inseticidas, tintas, plásticos, medicamentos, têxteis, solventes, fabricação de detergentes e, por causa do seu alto poder bactericida, é largamente empregado no tratamento de água potável e piscinas. Também é utilizado como intermediário nas sínteses químicas e nos processos de obtenção de numerosos produtos químicos, tais como: anticoagulantes, poliuretanos, lubrificantes, amaciadores de tecidos, fluidos para freios, fibras de poliéster, consumos farmacêuticos, etc. Também tem aplicação como matéria-prima no processo produtivo de cloreto de hidrogénio (gás), precursor do ácido clorídrico (líquido a 37%), de dicloroetano, que é um produto intermediário da rota de fabricação da resina plástica policloreto de vinilo (PVC), e do HS. Outras áreas de aplicação são os sistemas de aquacultura, na prevenção

ou tratamento de contaminações, na química orgânica como agente oxidante e na produção de clorados, clorofórmio e tetracloreto de carbono (<http://www.bndes.gov.br>).

1.1.1. *Hipoclorito de Sódio (NaOCl)*

De entre as formas comerciais de cloro, uma das mais utilizadas é o HS um desinfetante, também conhecido como solução de Dankin. Tem fórmula molecular NaOCl, massa molar de 74,44g / mol e 100% solúvel em água, com um pH aproximado de 11 (<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim495.htm>). Segundo Block (2001), um desinfetante é um agente que liberta um agente químico, podendo ser físico, com a capacidade de destruir doenças ou outros microrganismos nocivos, mas não é suficiente para matar esporos bacterianos, e o seu modo de ação é iniciado quando o desinfetante entra em contato e penetra a membrana citoplasmática da célula alvo, e impede ou atua intracelularmente, matando ou inativando o organismo. O HS é uma solução aquosa alcalina que não ocorre naturalmente no ambiente e é obtido através da reação do Cloro gasoso (Cl₂) com uma solução aquosa de hidróxido de sódio. Quando em solução aquosa, o HS dissocia-se dando origem a uma solução de hidróxido de sódio, ácido hipocloroso (HOCl) e o agente branqueador o ião hipoclorito (OCl⁻), sendo que o (HOCl) é mais eficaz como desinfetante (Figura 1)(Phillips and Spotts 1995).

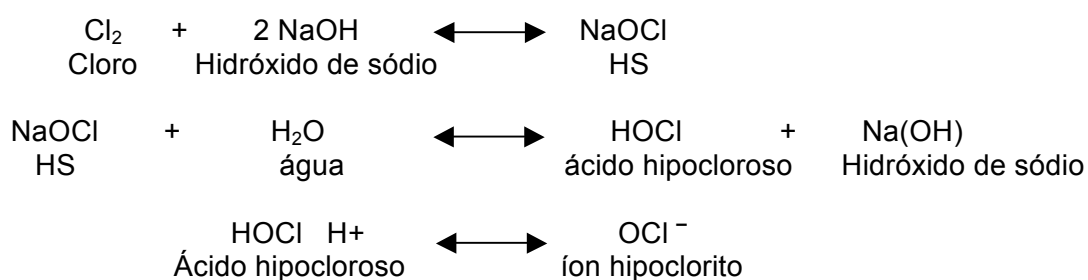


Figura 1 - Reação do cloro e hidróxido de sódio para produzir HS (adaptado de http://www.omegachem.com.au/docs/mega_handbook.pdf)

HS é o desinfetante preferencial para esterilização de superfícies em hospitais, para limpar superfícies antes da fermentação de cerveja ou vinho, para lavagem de frutas e legumes, alvejante para uso doméstico, tratamento de água, nomeadamente cloração no abastecimento de água potável e em piscinas (Bulloch et al. 2012), como sabão, para branqueamento de celulose, como desinfetante também na indústria química e em odontologia, e para tratar águas residuais efluentes de indústrias (Fernandes et al. 2009).

A ação do HS deve-se essencialmente à libertação de cloro ativo, com capacidade de inibir a reação enzimática no interior da célula e produzindo desnaturação e inativação do ácido nucleico.

Nos últimos anos foi feito um grande esforço para avaliar adequadamente a toxicidade das substâncias ativas com efeito desinfetante. Alguns estudos relatam os efeitos do HS em humanos (Hidalgo and Dominguez 2000). Há ainda estudos sobre os efeitos do cloro em peixes de água doce (López-Galindo et al. 2010; Sapone et al. 2007). A sensibilidade das espécies ao cloro varia muito, podendo o aumento da toxicidade ser devido a interações com outros fatores stressantes, nomeadamente a temperatura. A exposição a este agente induz diferentes respostas comportamentais, fisiológicas (Cooke and Schreer 2001), causando patologias nas brânquias, incluindo elevação epitelial, hipertrofia, hiperplasia, fusão lamelar e necrose em peixes. Os danos branquiais podem resultar em hipóxia e morte (Middaugh et al. 1977; Yonkos et al. 2000). A utilização na indústria deste desinfetante devido à sua elevada eficiência e baixo custo tornam difícil o processo de regulamentação diante dos órgãos competentes por ser amplamente utilizado.

1.1.2. Impacto ambiental

São inúmeros os impactos ambientais associados ao uso do cloro e seus derivados: depleção do ozônio, aquecimento global, toxicidade para o Homem e para os ecossistemas, acidificação, formação de gases poluentes, maus odores e produção de desperdícios sólidos (Bicho 2009). Compostos organoclorados provenientes de fontes industriais e domésticas em sistemas de esgotos, rios, ou lagos, mesmo quando liberados em baixas concentrações, podem causar efeitos adversos e impacto substanciais para os ambientes marinhos e costeiros (Moore et al. 2004). O cloro interfere nos sistemas ecológicos e altera os mecanismos biológicos e bioquímicos sendo uma substância tóxica para peixes, podendo ter até efeitos mais drásticos nomeadamente desenvolvimento ou atrofia das gónadas (Owens 1991), maturação sexual irregular com comprometimento da reprodução (Jenkins 2000) e alterações morfológicas em células sanguíneas (Soares 2000).

O cloro residual pode atacar qualquer material que venha a ser carregado pela água durante seu percurso. O cloro residual pode estar presente sob duas formas: a primeira

devido à formação do ácido hipocloroso ou Iona hipocloroso com ação bastante rápida e a segunda sob a forma da cloraminas com ação lenta.

A diretiva para peixes de água doce (CEC, 1978) afirma que o cloro residual (HOCl) não deve exceder 0,005 mg/l . Nos países desenvolvidos a nível global a concentração recomendada é de 1 mg/l nas principais fontes de exposição direta ao cloro (hipocloritos), que nos seres humanos passam pelo consumo de água potável e utilização de piscinas. Segundo as regras da Comunidade Europeia não existe um valor limite para o cloro nas águas de consumo humano, sobre este assunto apenas é referido que as concentrações utilizadas devem ser as menores possíveis e que não prejudiquem as populações humanas. Em Portugal o decreto de lei (Decreto - Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto) refere apenas um valor mínimo recomendado de 0,2 mg/l e um valor máximo recomendado de 0,6 mg/l de cloro residual para as águas de consumo humano, no entanto são apenas valores recomendados, não são obrigatórios por lei. E nas piscinas públicas, por lei o valor mínimo é de 0,5 mg/L e o valor máximo é de 2 mg/L de cloro residual (Decreto de lei nº 121/02 de 3 de Maio). A Comissão europeia publicou um documento de trabalho sobre a implementação da estratégia comunitária para disruptores endócrinos para uma série de substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais selvagens, o HS não está incluído, mas vem sendo descrito em estudos como causador de disrupção (EC 2000).

A sensibilidade às questões ambientais tem aumentado na sociedade, e em muitas áreas da indústria. Há uma preocupação crescente em relação à utilização do HS para desinfecção devido aos efeitos nefastos observados nos organismos aquáticos (Kostamo et al. 2004). Os efeitos potenciais desse desinfetante nas gónadas e desenvolvimento da tiroide em *D. rerio* ainda são pouco conhecidos daí a importância de estudar esse composto, havendo alguns trabalhos recentes que comprovam efeitos do HS na tiroide, sendo contudo insuficientes.

1.2. Sistema Endócrino

O sistema endócrino surgiu durante a evolução dos metazoários a partir da especialização de células, que em conjunto formaram os tecidos e deram origem ao sistema nervoso e endócrino (Junqueira and Carneiro 2004). O sistema endócrino é composto por glândulas que tem a função de produção e secreção de hormonas em que

essas são conduzidas pelo sangue, e são importantes na regulação das funções de determinados órgãos e tecidos, no entanto quando os órgãos e tecidos apresentam sensibilidade a esta hormona, estes passam a ser os alvos principais. Em humanos o sistema endócrino é composto por glândula pineal, glândula pituitária, glândula tiroide, glândula paratiroide e glândula adrenal. Nos peixes é formado pelo hipotálamo, glândula pituitária e hipófise, e pela glândula tiroide (Strete 1995).

1.2.1. Glândula Tiroide

A tiroide é uma glândula endócrina, que em todos os vertebrados se desenvolve na porção média ventral do epitélio da faringe e ocorre primariamente durante a fase embrionária (Takashima and Hibiya 1995) em humanos, mamíferos, carnívoros, pequenos ruminantes e teleósteos (Grau and Walter 1975) encontrando-se rodeada por tecido conjuntivo; é uma glândula secretora de hormonas tiroideas: a tiroxina envolvida na regulação da taxa metabólica basal e a calcitonina responsável pela homeostase do cálcio (Stevens and James 1997). Em humanos e outros mamíferos, a glândula tiroide é composta por dois tipos de células com atividade endócrina: os tirócitos que tem por função segregar as hormonas da tiroide e as células que se encontram entre os folículos, denominadas de células C ou células parafoliculares, que segregam a calcitonina (Bicho 2009). A glândula tiroide de muitos teleósteos é constituída por epitélio cubóide com espaços limitados cheios de uma substância chamada colóide, essa disposição celular, que separa o coloide, dar-se-á o nome de folículos da tiroide e, estes são responsáveis pelo armazenamento dessas hormonas (Takashima and Hibiya 1995). Nos mamíferos essa glândula apresenta-se protegida por uma cápsula; uma das características anatómicas nos peixes é que essa glândula não está encapsulada. Nalgumas espécies de teleósteos, ao contrário de outros vertebrados, essa glândula evoluiu para um órgão compacto, o que não ocorre com o *D. rerio* (Takashima and Hibiya 1995). Esses folículos também podem ser encontrados em outros órgãos tais como: rim, baço e coração, e são denominados como tecido ectópico (Leatherland and Ferguson 1997; Ramos and Peleteiro 2001), possuindo vários tamanhos e apresentando colóide no lúmen. Os folículos em *D. rerio*, estão distribuídos ao longo da aorta ventral (Figura 2), adjacentes à subfarínge onde apresentam maior atividade (Menke et al. 2011). Em *D. rerio*, o primeiro folículo da tiroide é diferenciado 55 h pós-fecundação e a tiroxina (T4) começa a ser produzida cerca de 72 h pós-fertilização. O primeiro folículo corresponde ao folículo anterior no adulto.

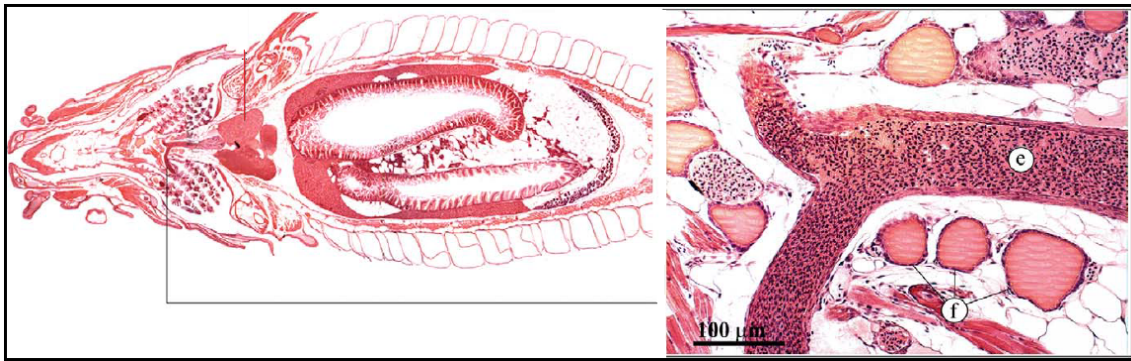


Figura 2 - Anatomia normal e histologia do folículo da tiroide no *D. rerio*, aorta ventral (c), folículos (f) (segundo Menke, 2011).

Os folículos captam o iodo e os aminoácidos do sangue para produzir as hormonas tiroideas (HT), triiodotironina (T3) composta por três moléculas de iodo e a tiroxina (T4) composta por quatro moléculas de iodo. A forma biologicamente ativa da hormona é a T3 que é obtida pela conversão do T4 no tecido periférico, pela remoção enzimática de uma molécula de iodo (Eales and Brown 1993) tornando-se assim funcional e mais potente nos teleósteos. Segundo Eales and Brown (1993) o modo de ação ainda não foi completamente entendido, ainda que muitos efeitos tenham sido atribuídos às HT.

1.2.2. Eixo Hipotálamo – Pituitária – Tiroide

Os processos iniciais de diferenciação de sistemas e órgãos nos peixes (Eales and Brown 1993; Ganeco 2007) dependem da ação de hormonas tais como: hormonas da tiroide (HT) e cortisol. O bom funcionamento da tiroide é importante no crescimento e desenvolvimento dos mesmos, pois uma “interrupção das HT, T3 e T4, pode resultar na aptidão reprodutiva reduzida, alterando o comportamento ou os caminhos fisiológicos” (Chan and Chan 2012). É possível avaliar o bom funcionamento da tiroide através do trabalho coordenado do eixo Hipotálamo – Pituitária – Tiroide (HPT), dos processos que estimulam o funcionamento desse eixo, e pelas hormonas por ele segregadas.

O hipotálamo tem por função a produção de tirotropina (TRH) e controla a quantidade de hormonas da tiroide em circulação no sangue. A glândula pituitária (hipófise), que está sob influência de células especializadas no cérebro quando estimulada secreta (TRH), induz a secreção das hormonas T3 e T4 e a produção de hormona estimulado pela tiroide (TSH). A TSH controla a síntese das HT que ocorre nos folículos tiroidianos, sendo importante na função durante o desenvolvimento larval, onde

aparentemente está envolvido no processo de evolução e diferenciação de tecidos (Ganeco 2007; García- Ayala et al. 2003).

A função da glândula pituitária é a síntese, armazenamento, liberação e controle relacionadas com diferentes funções tais como reprodução, desenvolvimento, crescimento, osmorregulação e metabolismo (Bicho 2009). Se os níveis de T3 e T4 estiverem baixos o hipotálamo liberta TRH estimulando a libertação de TSH pela hipófise (Bicho 2009). Deste modo, a TSH gera a produção de hormonas pela glândula tiroide de maneira a estabilizar e repor as quantidades normais para o organismo, porque o iodo circulante fica retido para ser liberado aos tecidos periféricos na forma de HT se for necessário. Assim quando ocorre o oposto, isto é, quando as quantidades de HT em circulação no sangue estão acima dos valores normais, o hipotálamo e a hipófise diminuem a libertação de TRH e TSH, induzindo uma menor produção de T3 e T4. Então, quando um organismo tem os níveis de HT elevados no sangue, esta apresenta grande atividade, diz-se que sofre hipertiroidismo; em oposição, a quantidade de hormonas abaixo dos valores normais e pouca atividade da tiroide denominam-se por hipotiroidismo. O funcionamento do HPT está representado na (Figura 3).

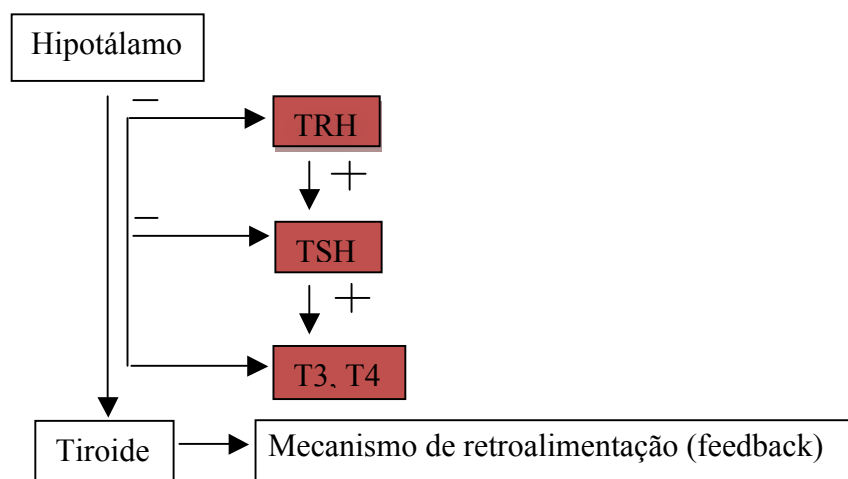


Figura 3 - Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide.

Existem ainda estudos para anfíbios e peixes, que indicam que a secreção de TSH pode ser estimulada por corticotropina sendo o seu fator principal de liberação. (Chan and Chan 2012; De Groef et al. 2006). O iodeto de sódio (IS) também está envolvido na síntese da hormona da tiroide, o IS é uma glicoproteína integral de membrana

plasmática que transporta ativamente o iodeto mediador nas células foliculares da tiroide (Dohán et al. 2003).

Devido á importância da TSH no desenvolvimento normal e das funções fisiológicas nos vertebrados, é fundamental reconhecer os compostos capazes de contaminar o ambiente e que venham a comprometer a função da tiroide ou sinalização, e avaliar o seu risco sobre a fauna e os seres humanos (Brucker-Davis 1998).

1.2.3. **Hormonas Tiroideas**

As hormonas tiroideas (HT) são importante na regulação do crescimento, desenvolvimento e diferenciação de tecidos e órgãos dos peixes, sem elas os mesmos estão impossibilitados de crescer e atingir a forma adulta (Klaren et al. 2008). As HT são sintetizadas nos folículos da tiroide, por uma camada de células epiteliais que encerram um espaço cheio de colóide. A T4 é a hormona presente nos folículos e é predominantemente secretada, tem poucas ações diretas e é considerada como uma precursora para T3 forma biologicamente ativa da hormona (Hadley 2000; Klaren et al. 2008). A T3 é obtida pela conversão de T4 no tecido periférico, com a remoção enzimática de uma unidade de iodo (Eales and Brown 1993) este já captado da corrente sanguínea.

A primeira etapa para a formação das HT (Figura 4) inclui a acumulação seletiva de iodo, com o transporte do iodeto para o interior, destas hormonas (Miot et al. 2010). A T4 contém quatro átomos de iodeto, a T3 é semelhante à T4, mas contém menos um átomo de iodeto por molécula. A glândula tiroide necessita de um mecanismo para acumular iodeto a partir do plasma, isso depende se ela está em repouso ou é estimulada (Bürgi 2010). Uma glicoproteína especial chamada de simporte de iodeto e sódio Na⁺/I⁻ (NIS, sodium-iodidesymporter) que está situada na membrana basal das células dos tirócitos, transporta o iodo (Kopp et al. 2008; Raldúa et al. 2012).

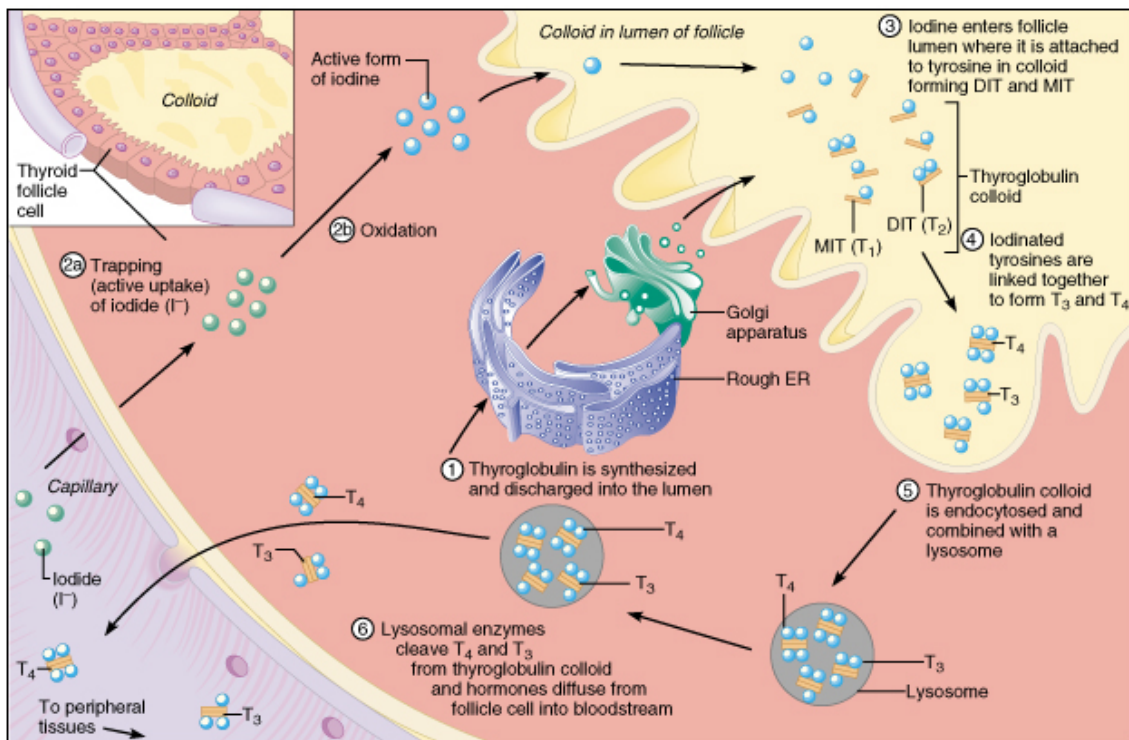


Figura 4 - A imagem representa as etapas da síntese das hormonas da tiroide (segundo www.uta.edu/biology).

O simporte utiliza dois catiões de sódio e um anião de iodeto na superfície da membrana da célula basal, com impulsos eletroquímicos do gradiente de Na^+ , realiza assim o transporte do exterior para o interior da célula (Bürgi 2010; Eskandari et al. 1997). A segunda etapa é a oxidação de iodeto, (I^-) a uma forma de iodo (I_2) que combina com o aminoácido tirosina, a oxidação é mediada por uma enzima peroxidase, que oxida o iodeto. O (I_2) liga-se diretamente aos anéis fenólicos dos resíduos do aminoácido tirosina nas moléculas da Tg (Santos 2009). Essa reação é catalisada pela peroxidase e deste modo forma-se a monoiodotirosina (MIT) e em seguida a diiodotirosina (DIT) que são precursoras das HTs (Raldúa et al. 2012).

Ainda ocorrem duas reações de agrupamento entre MIT e DIT, duas moléculas de DIT se combinam para formar T_4 e uma molécula de DIT combina-se com uma molécula de MIT para formar T_3 . Depois de terminada a síntese das HT, essas hormonas vão ser libertadas na corrente sanguínea e para se libertarem a T_4 é convertida em T_3 pela ação das enzimas iodotironinas desiodinases (ID), que removem uma unidade de iodeto do anel exterior que contém o grupo hidróxido (“ouerring”, ORD) da T_4 (Power et al. 2001). Essas hormonas continuam ligadas à Tg, e libertam-se quando ocorre a reabsorção de colóide pela célula, através de um mecanismo de endocitose. Influenciada

pela TSH, pequenas gotas de coloide, contendo Tg e TH, são formadas na superfície da célula folicular (tirócitos) e são absorvidas do lúmen para dentro das células foliculares. Após a entrada fundem-se com os lisossomas, formando os fagolisossomas. As ligações peptídicas entre os aminoácidos iodizados e a Tg são cortadas por enzimas proteolíticas libertando a T3 e T4 para a circulação. MIT e DIT permanecem na célula folicular e são desiodetadas pela enzima tiroide desiodinase. O iodeto produzido nesta etapa é reciclado para o reservatório intracelular. As moléculas de tirosina são incorporadas na síntese de nova Tg, T3 e T4 são clivadas da Tg e libertadas no sangue (Miot et al. 2010; Power et al. 2000).

Nos peixes, as lipoproteínas plasmáticas são de extrema importância no transporte de TH. O restante da T3, que não foi secretada é auxiliada por ID, a ORD produz a desiodinação da forma mais ativa das hormonas, T3, que tem afinidade alta com receptores intracelulares, enquanto a retirada de uma molécula de iodo da T4 ligada ao grupo L- alanina ("innterringdeiodination, IRD), forma a T3 reversa (rT3) que é uma molécula inativa (Bianco et al. 2002), a IRD da T3 produz a diiodotironina (T2). Tanto T3 quanto T2 são consideradas inativas 3,3'-T2. Representado na Figura 5. A T4 e T3 não ligadas a proteínas transportadoras denominam-se por T4 e T3 livres, respectivamente. A principal via para a inativação de TH é a desiodinação, que ocorre principalmente no fígado, rim, cérebro, e músculo. As ID também atuam como enzimas de inativação, sempre que os valores das mesmas na atividade biológica necessitem de ser controlados, embora a desaminação oxidativa e descarboxilação também possa atuar nesse processo, desempenhando a sua função. Desta maneira, a desiodinização controla os níveis destas hormonas, assim como a sua atividade biológica (Eales and Brown 1993; Power et al. 2001).

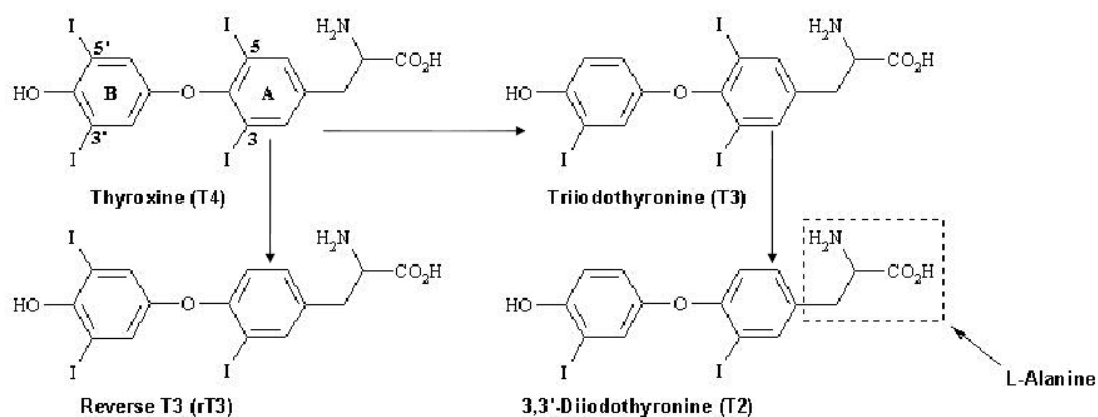


Figura 5 - Estruturas moleculares das hormonas da tiroide (segundowww.uta.edu/biology).

Parece haver semelhanças nos componentes do HPT nos vertebrados quanto às proteínas de ligação das HT, TSH, T4 e T3, desiodinases e receptores nucleares.(Power et al. 2001). Existem estudos que confirmam a existência destes receptores nos peixes: *D. rerio* (Liu et al. 2008). Segundo Eales (2006), apesar dos estudos acerca dos HT, não é possível fazer afirmações porque o seu modo de ação a nível molecular ainda não foi completamente entendido. Acredita-se que eles agem sobre a síntese proteica e posteriormente desencadeiam todas as ações.

Nos vertebrados, as HT circulam no plasma ligado às proteínas de ligação, que incluem a albumina, a transtirretina (TTR) e a globulina (Tg) de ligação à tiroxina (Power et al. 2001). A ação das HT é mediada pela ligação com os receptores nucleares que atuam diretamente nos genes-alvo, ligando-se a sequências específicas de ADN para aumentar ou diminuir a expressão gênica e trazer a resposta celular aos HT (Ganeco 2007). A T4 é convertida em T3 e a afinidade da ligação a esses receptores depende da hormona, a T3 é a que melhor se adapta e como as hormonas da tiroide são lipofílicas e atravessam as membranas das células facilmente (Abe et al. 2002; Bicho 2009), adentra o núcleo e liga-se a um receptor nuclear regulador da tiroide no ADN, estimula a transcrição do ADN, e assim são formados em grande quantidade RNAs mensageiros, que logo após a tradução nos ribossomas citoplasmáticos, sintetizarão uma variedade de novos tipos de proteínas, é por isso que a T3 é biologicamente mais ativa (Figura 5).

1.2.4. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas

A ativação de sensores específicos em teleósteos começa com as informações advindas por mudanças por fotoperíodo, temperatura ou odores específicos, na retina ou quimiorreceptores do epitélio volatório. O eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal (HHG) é regulado pelo sistema endócrino, que é responsável pela síntese e a liberação de hormonas na corrente sanguínea dos peixes. Controla seu ciclo reprodutivo desde a gametogênese, ao comportamento de desova, enquanto o SNC recebe e emite os sinais para o cérebro, advindos do meio ambiente (Baldiasserotto 2002).

Um dos componentes mais complexos do sistema endócrino é o sistema hipotálamo-hipófise que está localizado na base do cérebro, controla a maioria das glândulas endócrinas, e possui duas hormonas responsáveis pelo controlo do ciclo reprodutivo nos peixes: Hormonas gonadotrópicas I (GTH I) e hormona gonadotrópica II (GTH II), ambas denominadas de gonadotropinas (GnRH) e a dopamina. A GTH I é semelhante à hormona estimulante (FSH) situada na tireoide e é responsável pelo crescimento da gónada. A gametogênese, a entrada de vitelogenina no ovócito e a GTH II são importantes para a maturação final dos ovócitos e desova, além das hormonas esteróides gonadais que atuam na diferenciação e manutenção dos tecidos somáticos (ductos gonadais). Na gametogênese, estimulam as características sexuais secundárias e o comportamento reprodutivo semelhante à hormona luteinizante (LH) em mamíferos (Santos 2004). As GnRH estimulam a liberação das gonadotrofinas pela hipófise, enquanto que a dopamina inibe a liberação dessas gonadotrofinas, inibindo o efeito estimulante das GnRH. Ocorre um aumento considerável do GTH II na corrente sanguínea, estimulado pela hormona libertadora de (GnRH). E deste modo ocorre a estimulação, maturação gonadal, síntese e liberação de hormonas, indutoras da maturação final e ovulação.

As células germinativas dos testículos de teleósteos atuam em diferentes estágios de desenvolvimento. As células de Sertoli são fundamentais para a realização da espermatogénese e espermiogénese, pois são células responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas e as células de Leydig tem a função de produção de esteroides para a espermatogénese.

A GtH II age nos testículos dos teleósteos, aumentando a atividade da enzima 20 β -HSD (20 β -hidroxisteroidesdesidrogenase), que atua na conversão do colesterol em 17 α OH-P. A testosterona tem como precursora a 17 α OH-P, então um aumento na produção aumenta a formação da testosterona através da atuação da enzima C17-20liase. O aumento na síntese de 17 α OH-P e da testosterona leva ambas as substâncias a se difundirem para fora do tecido testicular. Quando atingem as células espermáticas, a 17 α OH-P funciona como substrato para a formação de 17 α 20 β -P. A 17 α 20 β -P é secretada nas células espermáticas e inibe a enzima C17-20liase no tecido testicular, de maneira que a 17 α OH-P já não seja utilizada na produção da testosterona. Deste modo, aumenta a difusão dessa substância para as células espermáticas, aumentando ainda mais a produção 17 α 20 β -P e reduz a produção de testosterona (Baldisserotto 2002).

Inicialmente, há um aumento dos níveis de testosterona para promover a maturação das gónadas e, no final do processo, um aumento de 17 α 20 β -P, mais ligado à fase final da reprodução. A 17 α 20 β -P é produzida nas células espermáticas, principalmente próximo da época da espermição (Figura 5) (Baldisserotto 2002).

A GTH II nas fêmeas, estimula a produção da substância indutora da maturação de ovócitos, a 17 α 20 β -P (17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona), nas células dos folículos ovários, por meio de um processo dividido em duas etapas: a primeira, a síntese da 17 α OH-P é estimulada pela GTH II a partir do colesterol nas células da teca. Na segunda sob influência da GtH II, a 17 α OH-P é convertida nas células da granulosa em 17 α 20 β -P. Uma parte da 17 α OH-P produzida nas células da teca é convertida em testosterona, a qual se difunde para as células da granulosa, e através da ação da enzima aromatase, é transformada em estradiol. Assim, no começo da liberação da GtH II, tanto a 17 α 20 β -P como o estradiol são formados e secretados nas células da granulosa. Parte de 17 α 20 β -P formada difunde-se para as células da teca e, assim como nos testículos, inibe a enzima C17-20liase, reduzindo a produção de testosterona e aumentando a quantidade de 17 α OH-P disponível para a formação da 17 α 20 β -P. Resultando no aumento da produção da 17 α 20 β -P e uma diminuição do estradiol produzido nas células da granulosa (Redding and Patiño 1993).

Além das hormonas libertadas pelas gónadas há outras que podem participar da reprodução, nomeadamente as hormonas tiroidianas. Deste modo, a energia disponível no peixe seria para o crescimento das gónadas e não para o crescimento corporal.

Contudo, em algumas espécies, as hormonas tiroidianas aumentam novamente no final da vitelogénese, na maturação gonadal e na desova, indicando que as reservas corporais são suficientes para a conclusão da maturação gonadal. A hormona de crescimento (GH) e a somatolactina, ambos libertados na hipófise, estimulam a libertação de esteróides nos testículos e ovários, mas têm uma potência menor do que as GtH I e II (Baldiasserotto 2002). Esse processo reprodutivo está representado na Figura 6:

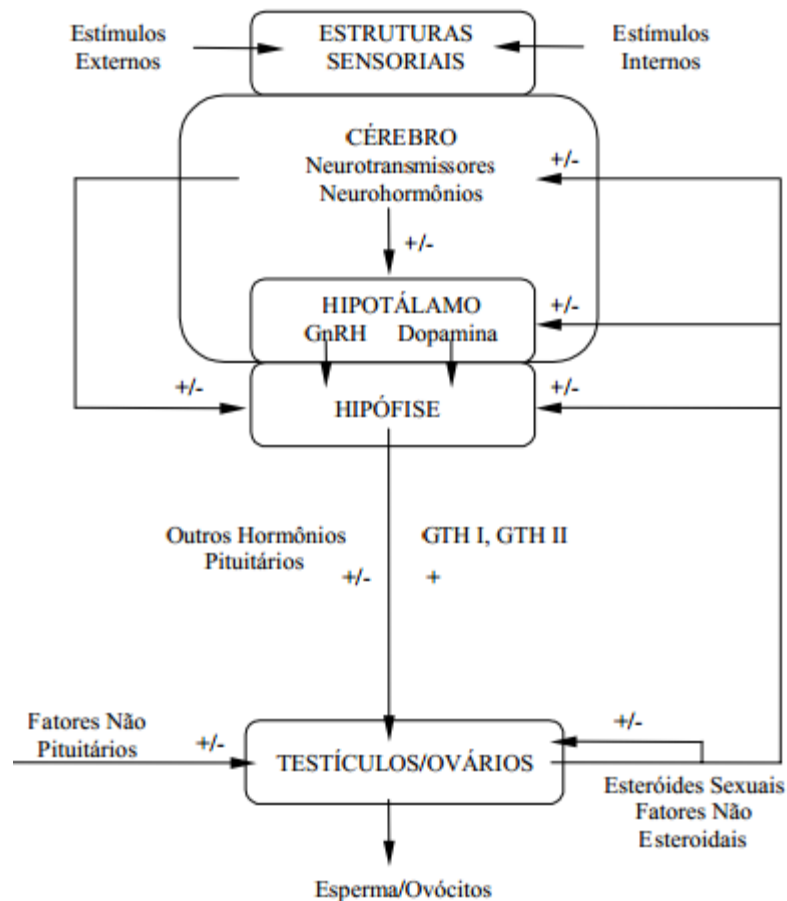


Figura 6 - Etapas envolvidas no processo reprodutivo de teleósteos, propostas por Redding e Patiño (1993), modificada por Sato(1999).

1.3. *Espécie modelo utilizadano estudo*

Danio rerio (peixe zebra ou paulistinha) é um peixe tropical de água doce, é nativo do sul da Ásia pertence à família Cyprinidae, ordem Cypriniforme, e têm em média de 4 a 5 centímetros. Alcançam maturidade sexual em cerca de três a quatro meses, que representa uma vantagem para estudos de toxicidade crônica, incluindo a facilidade com que pode ser reproduzido. Os embriões de *D. rerio* são populares em todo o mundo como sinônimo para o entendimento não apenas dos peixes, mas de todos os

vertebrados, incluindo o ser humano. *D. rerio* é considerado uma das espécies mais promissoras para avaliação em estudos toxicológicos com o uso de substâncias que possivelmente poderão ser consideradas como disruptores endócrinos (Dammski et al. 2011). O uso e controle dessa espécie é documentado durante anos e mais frequente entre europeus (Segner 2009).

O sucesso na reprodução dá-se através da separação de duas fêmeas para um macho. O acasalamento acontece quando o casal nada emparelhado, de um lado para o outro do aquário. A fêmea liberta os ovos que são fecundados pelo sêmen do macho e, por serem mais densos que a água, depositam-se no fundo do aquário, com uma proteção que impede o acesso dos peixes adultos (Spence et al. 2008).

Os machos são finos lateralmente e tem corpo fusiforme, dourados no abdômen, e apresenta uma linha incompleta lateral, com nadadeiras ventrais, pélvicas e de cinco a sete listras azuis escuras longitudinais situadas por trás do opérculo na nadadeira caudal, as fêmeas são maiores e podem ou não apresentar regiões douradas, a presença dessas listras ao longo do corpo deste organismo que deram o nome a esta espécie (Spence et al. 2008).

Convém lembrar o uso de *D. rerio* para determinar os efeitos tóxicos de produtos químicos na reprodução (Segner 2009) que será também base do presente trabalho, com a utilização do HS para avaliar os efeitos tóxicos no *D. rerio*.



Figura 7 - Casal de *D. rerio*, macho (esquerda) notavelmente mais esguio que a fêmea (direita). Foto: “scienceofsewing.blogspot.com”.

Semelhante a outros vertebrados, os peixes têm uma reprodução sexuada, a fertilização é externa e ocorre em meio aquático. A reprodução nos teleósteos é complexa, no entanto, a morfologia das células germinativas e os elementos somáticos constituintes do tecido da gônada são semelhantes nas várias espécies. Todas essas estruturas desenvolvem-se no sentido de produzir gametas férteis (ovócitos e esperma) necessários para a reprodução. O desenvolvimento das células germinativas, femininas e masculinas denomina-se gametogênese e decorre de processos meióticos, que se designam, respectivamente, por ovogênese e espermatogênese.

Os indivíduos de *D. rerio* nadam em conjunto, libertando os gametas na água. Os machos emitem o esperma que deve ser imediatamente seguido da liberação dos ovócitos pelas fêmeas, pois estes se tornam inviáveis rapidamente no contato com a água. No ovócito, encontram-se as informações genéticas e as reservas metabólicas necessárias para o desenvolvimento embrionário e posteriormente a sobrevivência da larva até a sua fase de vida livre.

1.3.1. Caracterização das gónadas masculinas

Os testículos do *D. rerio* são órgãos pares laterais, localizados na cavidade celômica e sustentados dorsalmente pelo mesórquio, revestido pela túnica albugínea, constituído de tecido conjuntivo, fibras elásticas, nervos e vasos, o qual emite septos para o interior do órgão. São preenchidos por túbulos seminíferos, constituídos de cistos, apresentam uma porção central e contínua que se comunicam com o ducto espermático, os espermatozóides maduros são conduzidos para o orifício genital por dois ductos diferentes que se fundem caudalmente (Figura 8). Em contraste com a espermatogênese de mamíferos, uma dada célula de Sertoli está em contato com apenas um clone de células germinativas cistos de células germinativas diferentes podem ser observadas durante o processo de espermatogênese (Menke et al. 2011).

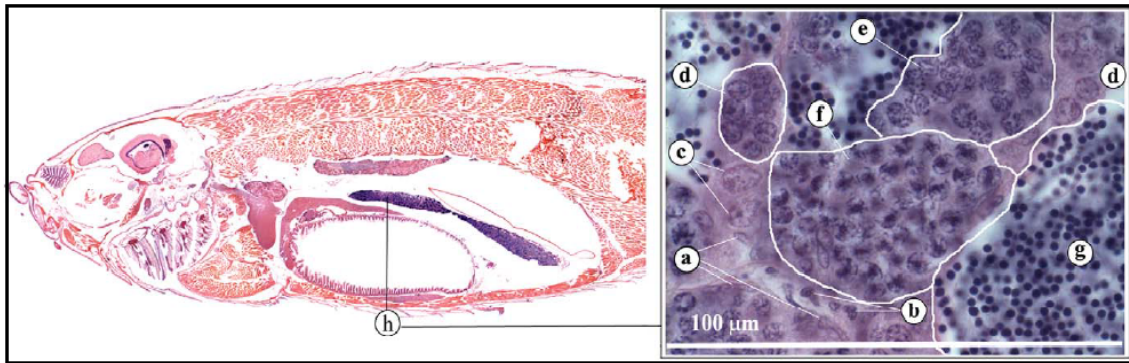


Figura 8 -Histologia normal do testículo de *D. rerio*. (a) células de Sertoli; (b) células de Leydig; (c) espermatogônia tipo I; (d) espermatogônia tipo II; (e) espermatócito; (f) espermatócito na primeira divisão meiótica; (g) espermátide madura; (h) testículos.

A forma, o volume, a coloração e a irrigação sanguínea varia nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo. A espermatogénese ocorre em cistos que são formados quando uma única espermatogónia é completamente rodeada pelo citoplasma projeções de uma ou duas células de Sertoli. Durante a espermatogénese, as células germinais primordiais (espermatogónias) sofrem mitoses, originando os espermatócitos, os quais se dividem meioticamente, dão origem às espermátides, que ao sofrer transformações, darão origem às células reprodutoras masculinas (Tabela I): os espermatozoides (Menke et al. 2011).

Tabela I- Descrição das fases da espermatogénese das células de *D. rerio* macho (segundo Johnson et al. 2009).

Fases	Descrição
Células de Sertoli	Células de núcleos alongados, nucléolos evidentes e citoplasmas indistinto, estão normalmente presente em pouca quantidade em comparação com as células germinais, podem assemelhar-se com as espermatogónias, e em alguns casos, pode estar hipertróficas (alargada, inchada)
Células de Leydig	Tem núcleo denso, escuro ou ovais e quantidades moderadas e evidentes de citoplasma, pouco vacuolizado. Apresentam-se como células individuais ou pequenos agregados, no interstício intralobular, em comparação com as células germinais, podem ainda assemelhar-se aos espermatócitos;
Espermatogónia (I)	A maior das células espermatogénicas, núcleos proeminentes, membranas nucleares distintas, grânulos citoplasmáticos per nucleares, quantidades moderadas de citoplasma;
Espermatogónia (II)	Estão geralmente presente em aglomerados maiores (>4). É necessária uma classificação para essas células antes de rotulá-las como “células claras” ou “células de luz”;
Espermatócito	Deriva das espermatogónias, têm núcleo evidente em uma das três fases da meiose: paquíteno, leptóteno ou zigóteno. Os espermatócitos primários são maiores que os secundários, e os últimos são derivados dos primários após a primeira divisão meiótica, em geral são as células espermatogénicas mais abundantes, contribuindo com um maior número de espermatocistos;
Espermátide	Deriva dos espermatócitos após a segunda divisão meiótica, possuem núcleo denso e citoplasma eosinófilo, são as menores células dentro do epitélio germinal, e perdem seu citoplasma durante a espermiogénese;
Espermatozoides	São células com núcleo escuro, redondo e citoplasmas e cauda pouco aparente em seções histológicas. São as menores células da espermatogénese e encontram-se espalhadas como células individuais no lúmen tubular;
Espermatocistos	É a unidade funcional do testículo, consiste num grupo funcional de células espermatogénicas, que são rodeadas pelos braços citoplasmáticos de uma célula de Sertoli. São mantidas por anexos intercelulares, até a maturação final e libertação dos espermatozoides ocorrer.

1.3.2. - Caracterização das gónadas femininas

Os ovários de *D. rerio* (Figura 9), são estruturas alongadas, que se encontram emparelhadas. São revestidos pela túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo,

fibras musculares lisas e vasos sanguíneos, a túnica emite septos em direção para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas, na quais se encontram os folículos ováricos. Os ovários direito e esquerdo unem-se na extremidade caudal para formar o ducto ovárico, que se comunica com a papila urogenital. O exame histológico dos tecidos do ovário revela ovos em diferentes estádios de desenvolvimento (Menke et al. 2011).

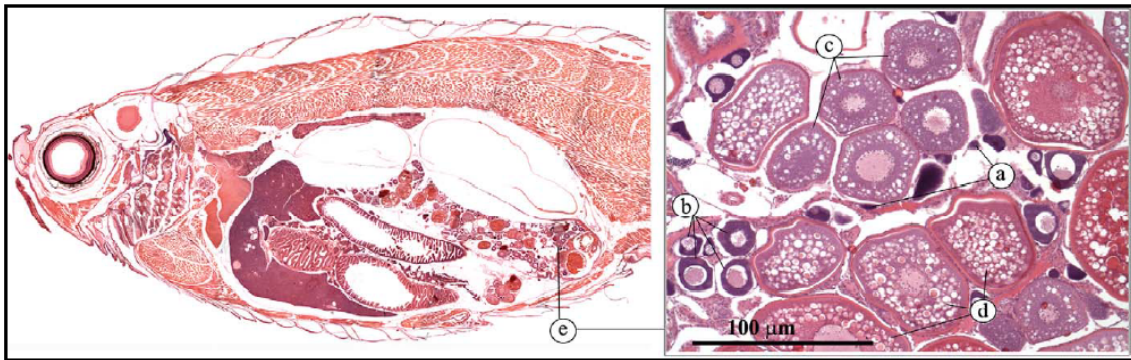


Figura 9 - Histologia normal ovário do *D. rerio*. (a) oogônia; (b) folículo pré-vitelogénico; (c) folículo vitelo génico; (d) folículo pré-ovulatório; (e) ovário.

Os folículos ováricos compreendem o ovócito, as células foliculares e a membrana vitelina. A ovogénese, em teleósteos, inicia-se com a proliferação e diferenciação de ovogónias através de processos mitóticos. Essas células germinativas primordiais podem apresentar-se em ninhos ou isoladamente. Caracterizam-se por apresentar citoplasma escasso, núcleo grande com nucléolo proeminente e originam ovócitos jovens, pré-vitelogénicos e vitelogénicos. Os folículos ováricos desenvolvem-se por processos meióticos até o completo desenvolvimento. Os folículos pós-ovulatórios são estruturas remanescentes nos ovários pós-ovulação, tendo a parede constituída por células foliculares e tecido conjuntivo (Menke et al. 2011).

Durante o processo de maturação do folículo ovárico, podem-se observar mudanças na sua morfologia, que caracteriza as cinco fases distintas no seu desenvolvimento, descritas na Tabela II.

Tabela II - Descrição das fases ovogênese para fêmeas *D. rerio* (segundo Johnson et al. 2009).

Fases	Descrição
Ovogónia	Células pequenas, em ninhos; o citoplasma é reduzido; o núcleo é grande com nucléolo único, basófilo e central;
Cromatina do ovócito	São ligeiramente maiores do que ovogónia, é rodeado por células resultante a partir do ninho germinal como um folículo primordial. O ovócito apresenta um tamanho maior, o citoplasma se torna mais volumoso, é ligeiramente mais denso e finamente granuloso, mas ainda reduzido em relação ao núcleo, que começa a sofrer fragmentação.
Ovócitos perinucleolares	Surgem vesículas citoplasmáticas na periferia do ovócito (sem afinidade por HE) e a membrana vitelina (envolvendo o ovócito). O citoplasma é mais volumoso e menos basófilo. Os nucléolos aparecem na periferia do núcleo. As células tendem a ser abundantes no ovário do adulto normal;
Oócitos corticais alveolares	Caracterizado pela presença de dois tipos de inclusões citoplasmáticas no ovócito: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo; a membrana vitelina sofre um espessamento, com estriações transversais evidentes. o córion torna-se claramente evidente nesta fase, e as células perifoliculares são mais facilmente visualizado.
Ovócitos vitelogénicos	O ovócito sofre um aumento de volume; o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo acidófilos; o núcleo apresenta o seu contorno irregular contendo diversos nucléolos basófilos na periferia; a membrana vitelina permanece inalterada.

2. Material e Métodos

2.1. *Organismos teste*

Os peixes zebra foram obtidos a partir de uma cultura estabelecida no Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Foram mantidos em água filtrada por carbono. A temperatura da água manteve-se controlada a 27°C com um fotoperíodo de 16:8h. A condutividade foi mantida a 550±50 µS, pH a 7.5±0.5 e saturação de oxigênio dissolvido a 95%. Os peixes adultos foram alimentados duas vezes ao dia com dieta artificial comercialmente disponível (ZM Granular 400) e artémia.

2.2. *Teste com HS: procedimento experimental*

Utilizou-se HS em solução aquosa de 10% (CAS Number: 7681-52-9) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O teste foi efetuado de acordo com o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico – OECD TG 204 teste de toxicidade crónica para peixe. O tempo de duração foi de 14 dias após os quais os organismos foram transferidos para meio limpo por mais 7 dias (recuperação), num total de 21 dias (4 réplicas para cada grupo)

Os peixes possuíam idade e comprimentos semelhantes (2 ± 1 cm, 1 ano de idade) e foram expostos as concentrações 0, 5, 50 e 500 $\mu\text{g/l}$ de HS em um desenho de teste sem-estático. Foram usados três aquários com dimensões: 53x26x30 cm, o volume da solução de ensaio de 5 L com 16 peixes em cada aquário foram utilizados por concentração. As concentrações de ensaio foram preparadas por diluição de um estoque de HS em água (pH $7,00 \pm 0,5$, condutividade 500 ± 50 ms e temperatura de $28,0 \pm 2$ °C). Durante a experiência, os peixes foram alimentados diariamente com dieta granular artificial ZM 400. Doze peixes de cada concentração foram amostrados nos dias 3, 7, 14, e após o período de recuperação (21 dias). Os peixes foram sacrificados e imediatamente fixados em DAVIDSON por 24 horas e foram postos em solução de álcool 70% até à data do processamento.

2.3. *Preparação histológica e análise morfológica*

A análise morfológica foi feita através da avaliação histológica do tecido da glândula tiroide e gónadas através de foto microscopia do tecido para a medição de parâmetros que indicam seu estado de atividade.

As técnicas de histologia utilizadas nesse estudo foram a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e coloração Cleveland–Wolfe (CW). Hematoxilina cora de azul ou violeta o núcleo das células, e a eosina cora o citoplasma de cor rosa (Junqueira and Carneiro 2004). Por outro lado a coloração CW foi utilizada para corar os folículos da tiroide (coloide de cor de laranja e tirócitos de roxo ou azul) e as outras células de cor púrpura, e assim realizar a medição dos folículos e verificar a atividade da tiroide. Os peixes utilizados foram previamente fixados em PFA a 4% durante a noite a 4°C para preservar as características morfológicas (Junqueira and Carneiro 2004).

A coloração hematoxilina/eosina envolve:

- 1) Hidratação dos tecidos, passagem por xilol 2X durante 15min e por uma série de álcoois: 10min etanol a 100%, 5min etanol a 95%, 5min etanol a 70% e 5min água destilada.
- 2) Imersão dos tecidos em hematoxilina durante 5min.
- 3) Lavagem com água da torneira durante 3min e passagem por água destilada.
- 4) Imersão dos tecidos em eosina durante 5min.
- 5) Lavagem com água destilada com umas gotas de ácido acético durante 3min e passagem por água destilada.
- 6) Desidratação por uma série de álcoois: etanol a 70%, 95% e 100% durante 5min.
- 7) Imersão em Kclear 2X durante 10min e montagem com DPX.

A coloração Cleveland – Wolfe implica:

- 1) Hidratação dos tecidos passagem 2x 15min por xilol e através por uma série de álcoois: 10min em etanol 100%, 5min em etanol 95%, 5min em etanol 70% e 5min em água destilada.
- 2) Imersão dos tecidos 5min em hematoxilina de Erlich.
- 3) Lavagem com água da torneira e depois com água destilada.
- 4) Imersão dos tecidos 5min em eritrosina 1% aquosa.
- 5) Lavagem com água da torneira e com água destilada.
- 6) Imersão durante 8-10 segundos com Orange G (2% em 1% ácido fosfotúngstico).
- 7) Lavagem rápida com água destilada.
- 8) Imersão com azul de Anilina aquoso (0,25% aquoso, acidificado para pH 3-4) durante 1,5min.
- 9) Lavagem rápida em etanol a 100% e depois 2x 5min em Kclear.
- 10) Montagem com DPX.

Os peixes foram fixados inteiros nos blocos para facilitar a localização dos folículos da tiroide e das gónadas nos cortes. Os cortes foram coronais, os peixes foram novamente lavados com água DEPC durante 2 h e logo de seguida colocados em cassetes e

embebidas em parafina num processador de tecidos Leica TP1020 que consistiu numa passagem por uma série de misturas álcool:etanol a 70% durante 10min, 95% 2X durante 30min, 100% 2X durante 1h. Depois passagem por soluções com xilol, xilol:etanol (1:1) durante 1h, xilol a 100% 2X durante 1h e 1h30min, xilol: parafina (1:1) durante 2h e por fim parafina pura durante 2h. Após esse procedimento os blocos foram para consola da Miles Scientific (Thermal Console, Dispensing Console e Cryo Console, Tisseu-Tek, Miles).

Efetuar-se cortes coronais do peixe inteiro com 2 μ m de espessura com um micrótomo Leica RM2125RT, foram separados por cestos para as diferentes colorações HeE e CW com 4 indivíduos controlo e 4 indivíduos tratados sujeitos a exposição de 0, 5, 50 e 500 μ g/l de HS. Posteriormente foi colocado em lâminas de vidro, o que permite uma melhor aderência dos tecidos às lâminas. De cada bloco de parafina foram feitos 50 cortes. Procedeu-se a coloração das lâminas, com HE em seguida as lâminas com a coloração Cleveland – Wolfe (1932) para fazer as medições.

2.3.1. **Tiroide**

Na tiroide foram medidas a área total dos folículos da tiroide e a altura das células epiteliais (tirócitos) em um total de 20 folículos por peixe (Figura 10). As medições foram feitas em quatro células dentro em cada folículo num ângulo de 90° uma da outra. Em seguida foram calculadas as médias.

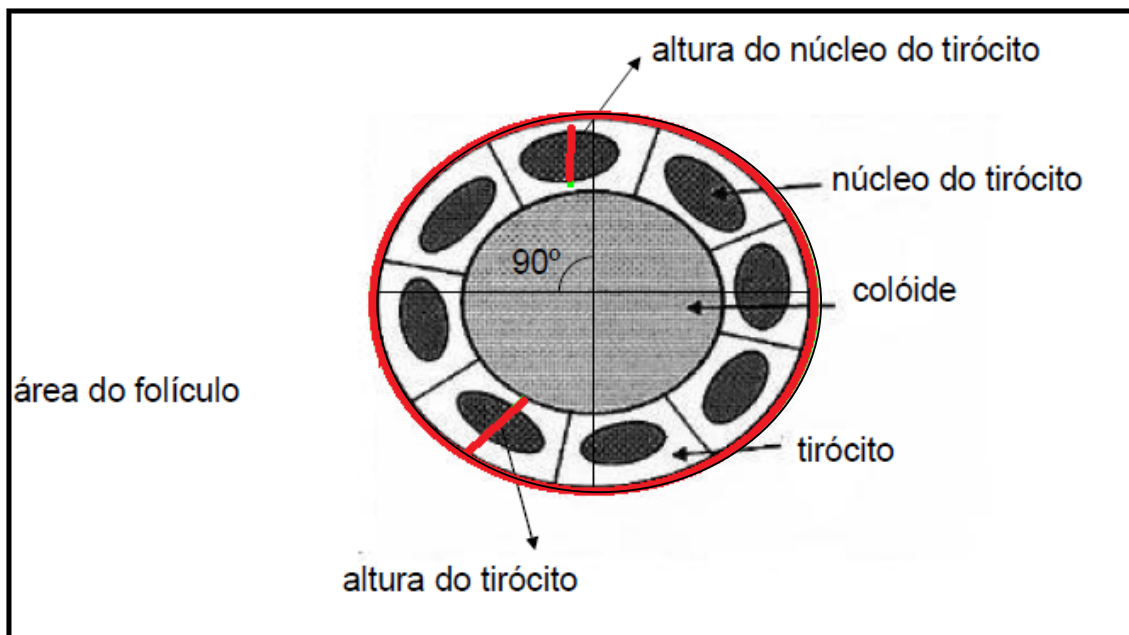


Figura 10 - Esquema representativo de um folículo da glândula tiroide. Ilustração da medição da área total do folículo e da altura de um tirócito (segundo Rita Bicho).

2.3.2. Gônadas masculinas

Neste trabalho foram medidos nas gônadas masculinas a área do lúmen dos túbulos seminíferos, o diâmetro e a altura da franja espermatogénica (30 túbulos por indivíduo) medidos sempre do lado direito (Figura 11), foram analisadas as médias para verificar os efeitos, nos túbulos seminíferos que contém as células germinativas em fases de crescimento na espermatogénese (células de Sertoli (Cl), células de Leydig(Cl), espermatogónia (Sg) tipo I, espermatogónia (Sg) tipo II, espermatócito (Sc), espermatíde (St), espermatozoides (Sz) e espermatocistos, no ciclo germinativo dos macho de *D. rerio*.

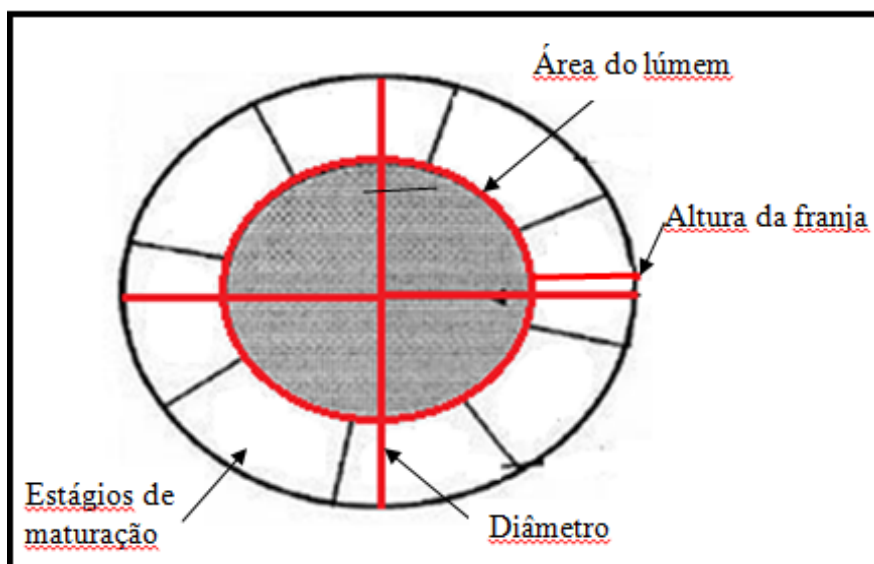


Figura 11 - Esquema representativo da medição do túbulo seminífero. Medição da área total do lúmen do diâmetro e da altura (lado direito) da franja espermatogénica.

2.3.3. Gônadas femininas

Nas gónadas femininas a quantificação dos estágios de desenvolvimento das células foi feita através do método de contagem, foram estudados 6 estágios: (ovogónia (Oo), cromatina do ovócito (Co), ovócito perinuclear (Op), oócitos corticais-alveolares (Cao), início dos ovócitos vitelogénicos (Ov), maturação final dos ovócitos vitelogénicos (Mo), ovócitoovulado (OO), Ovócito atrésico (Ao), e tecido conjuntivo. As diferenças de estágios consideradas durante a oogénese, foram distinguidas com base em critérios morfológicos seguindo o protocolo da OECD para *D. rerio* (Johnson et al. 2009). Foram tiradas 15 a 20 fotografias; uma fotografia de uma seção separada e de uma área selecionada na seção (3 a 5 fotografias para cada espécime), em que número de células foi contado por área, 27 perfis por área (Gundersen et al. 1998), contendo de 100 a 200 células por indivíduo, divididas através de quadrantes (estes ainda divididos por 72 pontos) assumindo deste modo regras de contagem em que as células contadas não foram afetadas pela forma, pelo tamanho, pela orientação e pela distribuição e desse modo foi possível fazer a contagem e abranger toda área da gónada e estágios de desenvolvimento (Figura 12).

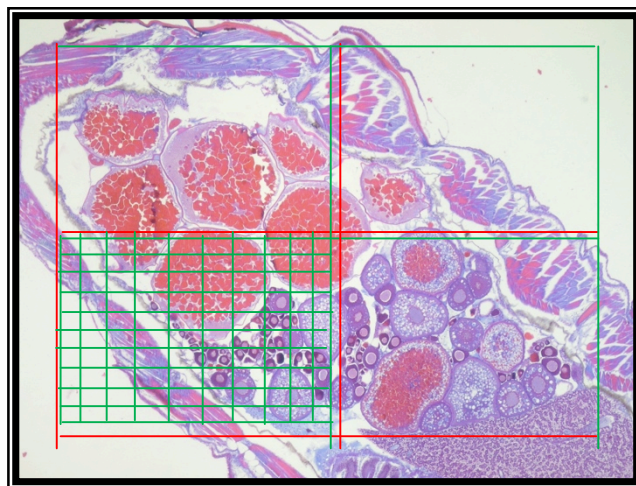


Figura 12 - Representação da contagem das células da gônada das fêmeas com a utilização de quadrantes. Observação com ampliação de 400x e coloração HeE.

Cada fotografia foi analisada utilizando o programa *ImageJ*. Para análise de imagem, utilizou-se a malha de pontos sobreposta em cada fotografia. Em cada partícula de interesse, células, núcleos e nucléolos foram contados quando se encontrava completamente dentro do quadro de contagem, quando tocavam os pontos ou quando tocavam a linha de aceite (linha verde), sem tocar na linha de rejeição (linha vermelha). A distância da borda foi de 2 centímetros. Quando a célula tinha dimensões maiores e cruzava o quadro de contagem, apenas era consideradas se estivesse no quadro 3, porque na junção de quadros as partículas deste quadro não tocam nenhuma linha de exclusão, excluindo a possibilidade das células serem contadas duas vezes. Foi possível avaliar diferenças no número de células nas sucessivas etapas do desenvolvimento do ciclo (ovogônia, cromatina do ovócito, ovócito perinuclear, oócitos corticais alveolares, ovócitos vitelogénicos, maturação final dos ovócitos vitelogénicos) mediante a diferença no número de pontos contendo as fases de maturação, deste modo foi feita a contagem das células das gónadas das fêmeas. Para as fêmeas foi postulado que o HS causaria efeito no desenvolvimento das células (atraso), apresentando diferenças a partir dos parâmetros testados, a hipótese alternativa por sua vez foi postulada que não ocorreria diferenças nos estágios (ST1 a ST6). Assim sendo as variáveis dependentes foram os valores contendo as células nos diferentes estágios, (ovogônia, cromatina do ovócito, ovócito perinuclear, oócitos corticais alveolares, ovócitos vitelogénicos, maturação final dos ovócitos vitelogénicos) e as variáveis independentes o tratamento e o dia, para verificar se realmente o HS, interfere ou influencia no desenvolvimento das gónadas de *D. rerio* em função da concentração de HS ao longo do tempo.

Para executar as medições da tireoide e gônada masculina e femininas as imagens foram obtidas através de um microscópio (*Olimpos U-PMTVC*) acoplado a uma câmara digital (*Olympus DP 11*), e posteriormente medidas através de um programa de manipulação de imagem (*Image J*).

2.4. Análise estatística

A análise estatística foi utilizada para determinar efeitos significativos nos tratamentos com HS, utilizando as médias das pseudoréplicas de cada grupo. As análises foram efetuadas através do SigmaPlot 11.0. Após verificação da normalidade e homogeneidade de variância dos valores médios medidos para cada indivíduo procedeu-se à análise de variância (ANOVA) uni (efeito do tratamento nos tubos seminíferos) ou bifatorial (efeito do tratamento x dia nos tirócitos). O teste de Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparação dos tratamentos nas situações em que se observaram efeitos significativos associados aos tratamentos. A comparação dos estádios de maturação entre os diferentes tratamentos para os diferentes momentos de amostragem foram testados através do teste do Qui-quadrado. Não foram efetuadas comparações entre sexos no caso da tireoide pois os dois sexos encontravam-se distribuídos de forma não equilibrada entre tratamentos (não é possível saber o sexo dos indivíduos com exatidão no início do teste). O nível de significância utilizado em todos os testes estatísticos foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Tireoide

Através da medição da área folicular e altura dos tirócitos, observou-se uma possível alteração do estado de atividade da glândula tireoide. As lâminas analisadas do tecido da tireoide de indivíduos sujeitos a exposição de 0, 5, 50, 500 $\mu\text{g/l}$ NaOCl foram minuciosamente observadas. Os folículos eram pequenos, todos apresentaram muito coloide, alguns com vacúolos, houve ainda folículos vazios.

Em relação a altura dos tirócitos, a ANOVA (Tabela III) indicou que houve diferenças significativas entre os tratamentos, entre os dias de amostragem e ainda interação entre tratamento e dia ($p < 0,001$). No grupo controlo, houve um aumento da altura dos

tirócitos que corresponderá ao desenvolvimento normal das células ao longo do tempo (Figura 13). Nos dias 7 e 14, não se verificaram diferenças significativas na altura dos tirócitos. No dia 21 a altura dos tirócitos dos peixes expostos a 0 e 5 $\mu\text{g/l}$ era superior às dos peixes expostos a 50 e 500 $\mu\text{g/l}$, observando-se redução do epitélio dos folículos (Tabela III) uma alteração da forma das células e altura dos tirócitos, sem alteração da área: as células que são originalmente cubóides, adquiriram uma forma mais prismática (Tabela III).

Em relação a área total dos folículos (Figura 15), não houve diferenças significativas, entre tratamentos e entre dias de amostragem (Tabela III).

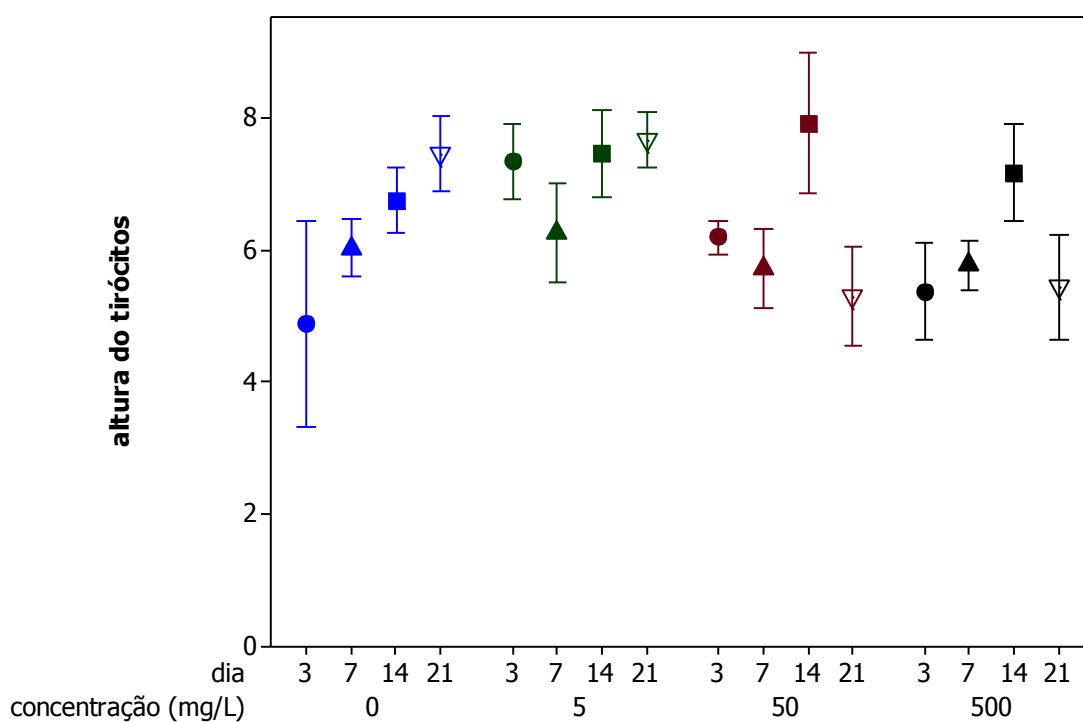


Figura 13 - A figura indica a média e intervalo de confiança a 95% da medição da atividade da tiroide em *D. rerio*. Medição da altura dos tirócitos dos folículos de secções da tiroide dos indivíduos sujeitos a 0, 5, 50 500 $\mu\text{g/l}$ de HS (n=20 para cada grupo controle e tratamentos). Símbolos a cheio - Período de exposição; Símbolos em branco - Período pós-exposição.

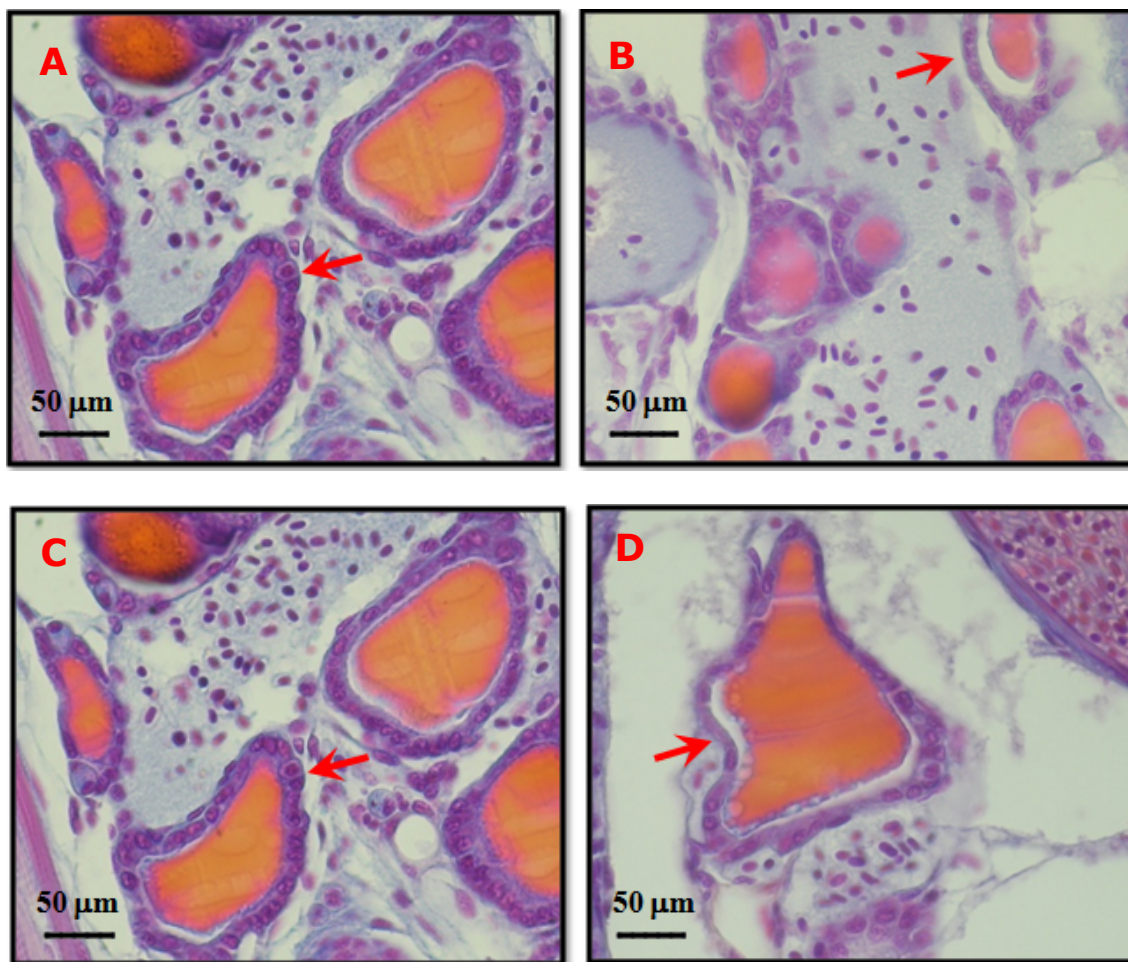


Figura 14 - Foto micrografia de corte histológico do tecido da tiroide de *D. rerio*. **A** corte histológico do folículo de peixe controle no dia 21; **B** deformação do epitélio de peixes expostos a 50 µg/l , dia 21; **C** corte histológico do folículo de peixe controle no dia 21; **D** deformação do epitélio do folículo e aumento na altura dos tirócitos exposto a 500 µg/l no dia 21. Observação com ampliação de 400x e coloração CW.

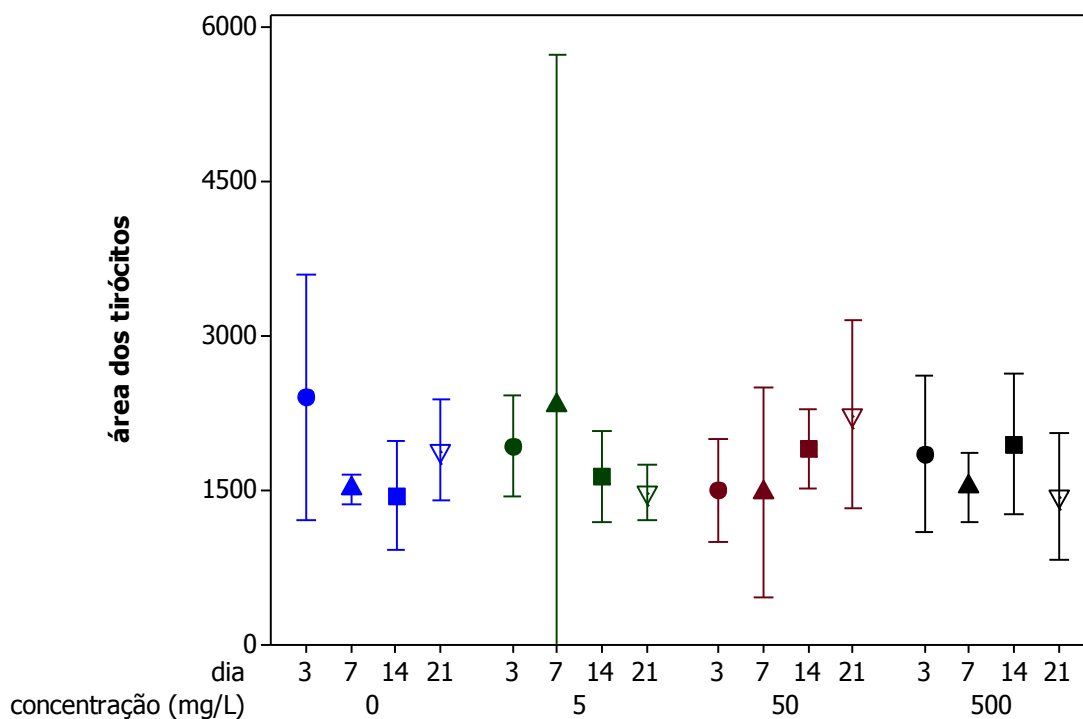


Figura 15 – A figura indica a média e intervalo de confiança a 95% da medição da atividade da tiroide em *D. rerio*. Medição da área dos folículos de secções da tiroide dos indivíduos expostos a 0, 5, 50 500 µg/l de HS expostos a 14 dias com 7 d para recuperação n=20 para cada grupo controle e tratamentos. Símbolos a cheio - Período de exposição; Símbolos em branco - Período pós-exposição.

Tabela III - ANOVA bifatorial do efeito da concentração de HS na altura e área dos tirócitos de *D. rerio* (após transformação pela raiz quadrada).

Variável	Fator	F	Gl	p
Altura	Tratamento	10,652	3, 130	<0,001
	Dia	16,247	3, 130	<0,001
	Tratamento x dia	6,397	9, 130	<0,001
Área	Tratamento	0,447	3, 130	0,720
	Dia	0,387	3, 130	0,763
	Tratamento x dia	1,463	9, 130	0,168

3.2. Gónadas masculinas

A análise histológica das gónadas masculinas, dos grupos expostos as diferentes concentrações de HS, revelou que não houve diferenças significativas na análise dos parâmetros diâmetro do túbulo seminífero, área do lúmen e altura da franja espermatogénica, quer entre concentrações ou dias de amostragem (Tabela IV) (dados não mostrados).

Tabela IV –ANOVA unifatorial para a altura e área dos túbulos seminíferos e altura da franja de machos de *D. rerio* após exposição a diferentes concentrações de NaOCl.

Parâmetro	F	Gl	P
Área do lúmen	0,798	11, 28	0,641
Diâmetro	2,069	11, 28	0,059
Log Altura da franja	1,809	11, 28	0,100

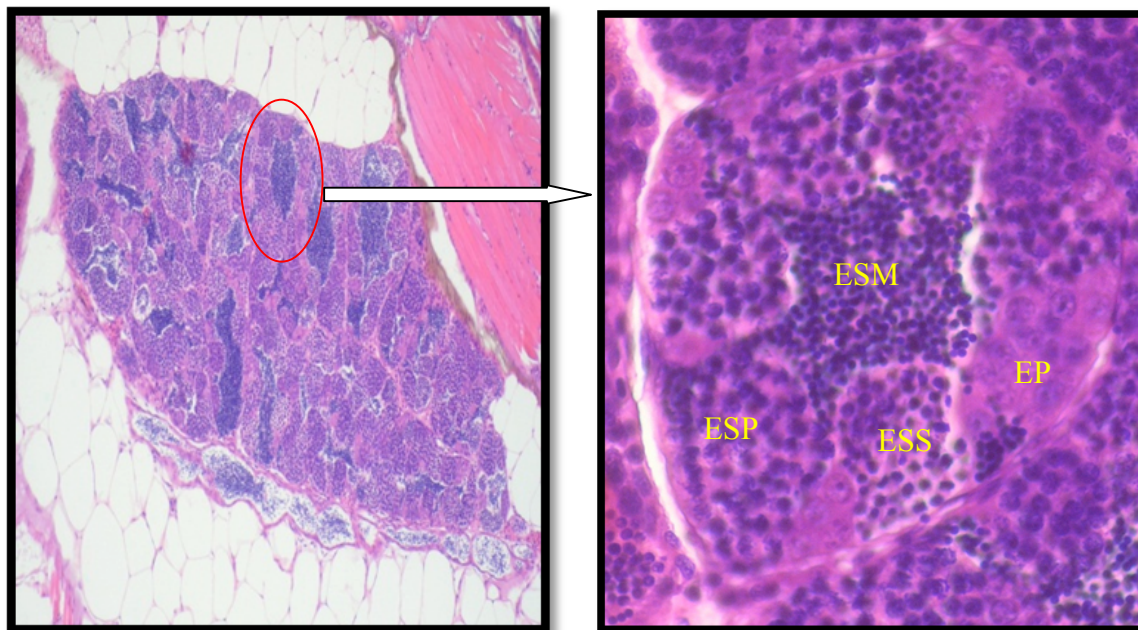


Figura 16 - Fotomicrográfrica de um corte histológico de gónada de macho da espécie *D. rerio* do grupo controlo. Túbulo seminífero; Espermatogónia (EP), espermatócito primário (ESP), espermatócito secundário (ESS), espermatíde (ESM). Observação com ampliação de 400x e coloração H.E

3.3. Gónadas femininas

Nas gónadas femininas, analisadas histologicamente, foram caracterizadas as oito fases de desenvolvimento dos folículos ováricos (ovogénese) para *D. rerio*, já descritas na Tabela II. Folículos atrésicos e folículos vazios não foram considerados com fase de desenvolvimento nas contagens, portanto foram consideradas como estruturas provenientes do referido processo. O teste do Qui-quadrado (Tabela V) indicou a existência de uma dependência significativa ($p < 0,001$) entre o tratamento e o período das observações, com atraso nos estágios de desenvolvimento entre os tratamentos nos diferentes dias, com exceção do primeiro estágio (oogónias) (Figura 18, A) correspondendo à fase inicial de maturação dos oócitos. O número de células nos diferentes estágios de maturação é dependente dos tratamentos, indicando um efeito do HS nas gónadas femininas (Figura 18, B). Nos dias 3, 7 e 14 há uma maior proporção de células com níveis de desenvolvimento superiores (Oca, Ov1, Ov 2 e células maduras) nas concentrações 0 e 5 mg /L em relação às concentrações mais altas. Estas diferenças já não são tão notórias aos 21 dias (Figura 17). Todos os cortes histológicos apresentaram os mesmos estágios de desenvolvimento e estruturas no que concerne à

organização da gônada, afinidade por corantes e morfologia das células. (Figura 18, C). Os folículos observados estavam sempre preenchidos por ovócitos (Figura 18).

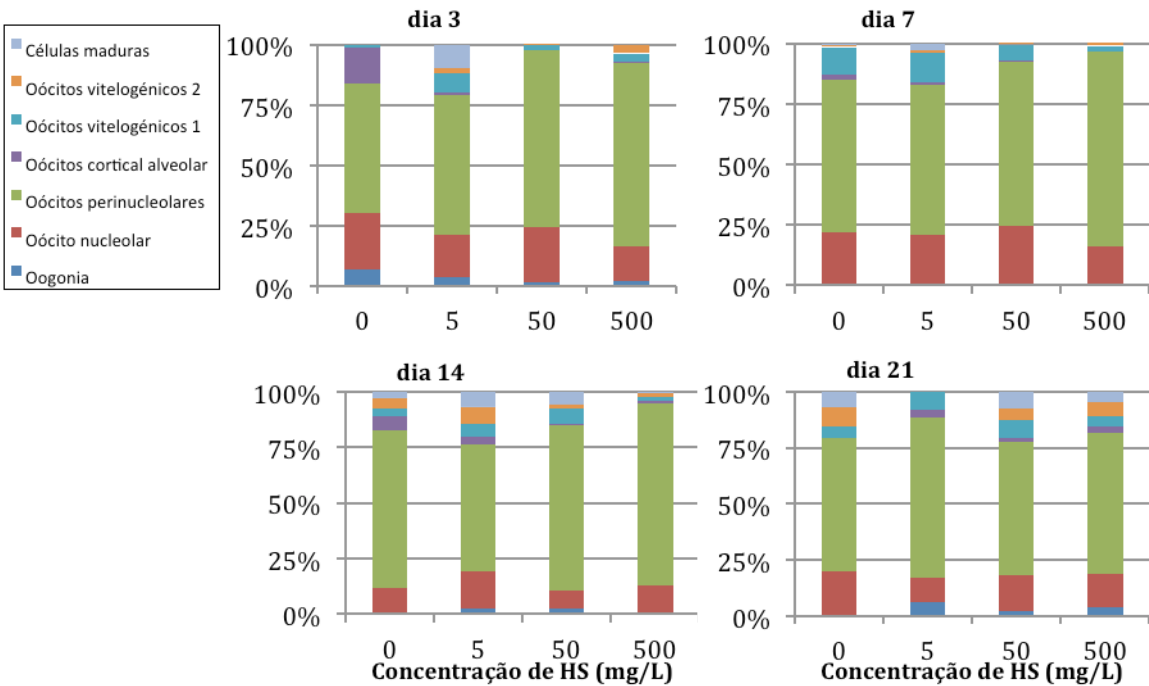


Figura 17- Distribuição relativa, ao longo do tempo, dos diferentes estádios de maturação das células ovocitárias em função da concentração de HS a que as fêmeas de *D. rerio* estiveram expostas.

Tabela V - Comparação do efeitos dos tratamentos nos estágios de desenvolvimento dos oócitos de *D. rerio* expostos as diferentes concentrações de NaOCl. (Oo - Oogonia; On - Oócito nucleolar; Op - Oócitos perinucleolares; Oca - Oócitos cortical alveolar; Ov1 - Oócitos vitelogénicos 1; Ov2 - Oócitos vitelogénicos 2; S –significativo; NS - não significativo).

	(Oo)	(On)	(Op)	(Oca)	(Ov1)	(Ov2)	Global
χ^2	19,385	53,339	13,411	38,726	81,288	81,173	287,322
GL	15	15	15	15	15	15	90
p	0,196	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	NS	S	S	S	S	S	S

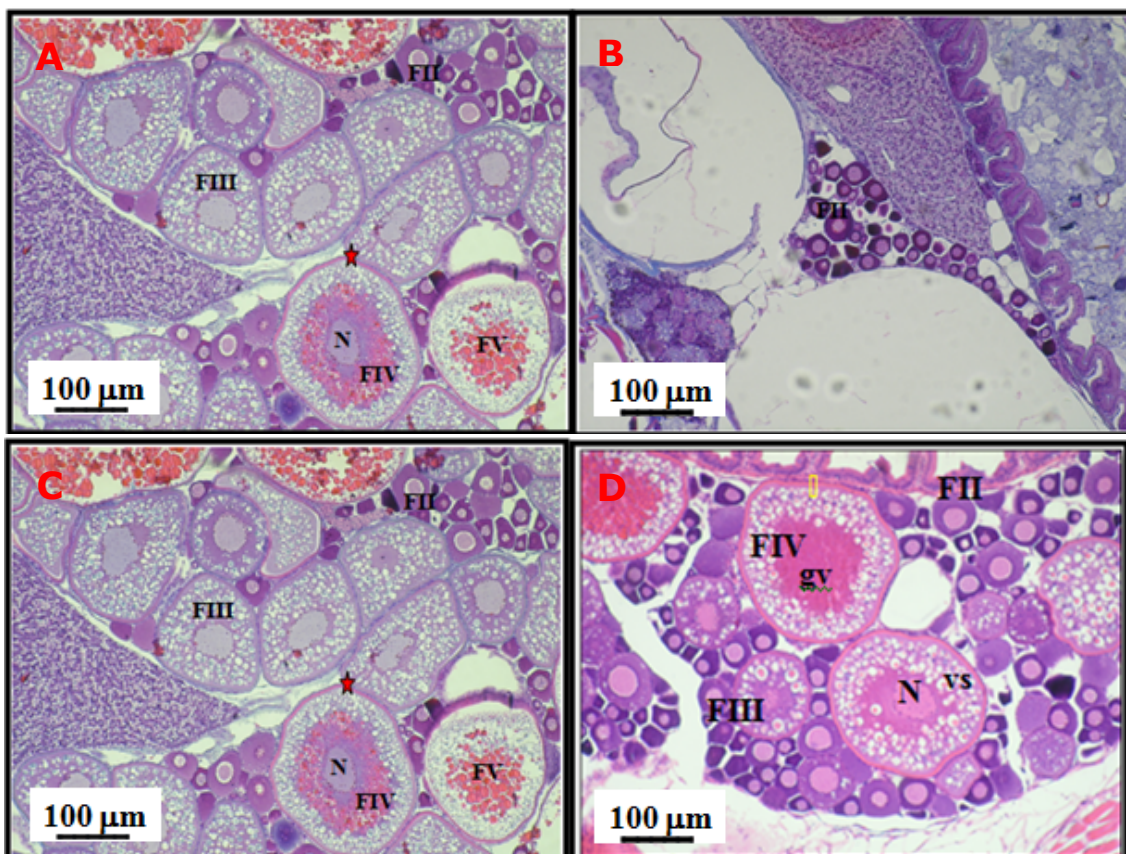


Figura 18 - Fotomicrográfica de corte histológico de gônada de fêmea da espécie *D. rerio* do grupo controle A e C, 3 dias 0 µg/l e tratados B, 21 dias 50 µg/l HS e D 21 dias (pós-exposição) 500 µg/l HS. Fases de maturação das gônadas II, III, IV e V (FII, FIII, FIV, FV, respectivamente), núcleos (N), vesículas citoplasmáticas (vs), grânulos de vitelo (gr), células foliculares (↑), membrana vitelina (★). Observação com ampliação de 100x e coloração HeE.

4. DISCUSSÃO

O HS é um produto de desinfecção e branqueamento, está entre um dos mais utilizados no mundo. A presença de compostos destes no ambiente aquático conduz a exposição crónica de peixes, que se apresentam como alvos sensíveis (Holbech et al. 2012; Janssen et al. 1997; Routledge et al. 1998). O HS não está listado pelas autoridades como uma substância causadora de disrupção endócrina, no entanto há suspeitas nesse sentido; assim há necessidade de desenvolver ensaios para elucidar este possível mecanismo de ação (www.pesticideinfo.org) (Holbech et al. 2012).

Existem numerosos dados de toxicidade de produtos de desinfecção contendo cloro, muitos dos quais têm sido relatados como causadores de disrupção na tiroide. O HS possivelmente pode ser um disruptor endócrino podendo afectar organismos aquáticos e mamíferos (www.pesticideinfo.org). Alguns estudos com compostos clorados mostraram que concentrações subletais de HS afetam o comportamento do peixe-zebra, alterando a velocidade de natação que tende a aumentar com a concentração (Nimkerdphol and Nakagawa 2008; Verma et al. 2007). Também um estudo feito com juvenis de *Solea senegalensis* demonstraram a toxicidade do HS, nos tecidos das brânquias com diversas patologias (López-Galindo et al. 2010).

Apesar das diferenças anatômicas entre peixes e mamíferos, o eixo hipotálamo-pituitária-tiroide está também presente no *D. rerio* permitindo o estudo, neste modelo, de aspectos diretamente relacionados com o efeito de substâncias tóxicas nos níveis das hormonas, por exemplo, na histologia e síntese dos hormonas na tiroide (Jugan et al. 2010). Estudos com tilápia exposta a 1 mg/l após eclosão e uma exposição contínua de 0,01 mg/l HS durante 21 dias revelaram uma redução nos níveis de circulação da hormona T4 e efeitos na atividade da tiroide (Bicho 2009; Jugan et al. 2010). Estudos efetuados em vários vertebrados aquáticos expostos ao cloro mostram que exposições prolongadas a concentrações ambientalmente relevantes, afetam os folículos da tiroide (Mukhi and Patiño 2007).

No presente estudo o HS afetou as células dos folículos da tiroide com uma alteração na forma, sem que a área das mesmas tenha sofrido alteração. Os resultados mostram uma alteração nos folículos da tiroide, por outro lado, indicam uma diminuição da atividade da tiroide, sem alterar o volume dos folículos, ou seja, um aumento na altura das células

do epitélio da tiroide, sem alteração da área. Os parâmetros área e altura tem relação direta com o nível de atividade e da hormona de estimulação da tiroide (TSH), de modo que a produção das hormonas da tiroide é alterada (McNabb et al. 2004). Os níveis de T4 no sangue baixos estimulam o hipotálamo para produzir hormona libertadora da tirotropina (TRH), que então estimula a pituitária para produzir a hormona estimulante da tiroide (TSH), que por sua vez, estimula a síntese de TSH, com um consequente aumento das hormonas para a circulação capilar (Takashima and Hibiya 1995).

As concentrações de hormona da tiroide em circulação representam apenas um componente do controle no eixo HPT de vários níveis metabólicos do tecido alvo (Abbas et al. 2012; Hadley 2000). Por conseguinte, quando há redução das HT na circulação, há também a resposta do HPT, induzindo a um aumento na TSH resultando em um estado de hipotrofia. O contrário também ocorre, quando as hormonas da tiroide encontram-se em quantidades elevadas na circulação resulta numa diminuição da produção de TRH com baixa secreção de TSH que diminui, são sinais do processo chamado feedback negativo, sendo causa de hipertrofia (Bicho 2009; Capen 2001; Hadley 2000). Algumas dessas respostas no HPT são conhecidas por ocorrer em mamíferos com deficiência de iodo (Delange and Ermans 1996). Pode-se dizer que o estado hipotrófico das células dos folículos da tiroide (tirócitos) evidenciado neste estudo deu-se por causa da grande quantidade de hormonas na circulação, e da baixa produção de TSH verificado através da grande quantidade de colóide dentro do lúmen dos folículos, confirmando o estado não ativo da tiroide e confirmando que o HS causa efeitos idênticos aos reportados em estudos com tilápia moçambicana (Bicho 2009).

Durante o período de exposição não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos relativamente aos parâmetros da tiroide. Contudo, no dia 21(7 dias após a exposição) para os tratamentos de 50 e 500 µg/l de HS os tirócitos apresentaram uma diminuição da altura das células, sem alteração da área, com alterações na forma das células. Este facto poderá estar associado a uma alteração da atividade da tiroide (Strete 1995), uma vez que as células foliculares variam em tamanho e forma, de acordo com a atividade da glândula (Abbas et al. 2012; Volkoff et al. 1999). Estudos efetuados em alevins de *Solea senegalensis* mostraram que células epiteliais colunares contendo pouco colóide e com vacúolos com espaços refletem uma elevada atividade deste órgão (Delgado et al. 2006). Os efeitos observados nas células da tiroide, 7 dias após a fase de exposição, poderão ser devidos à ação retardada do tóxico sobre as células da

tiroideuma vez que o período de exposição de 14 dias não foi suficiente para evidenciar estes efeitos. Os efeitos observados estão de acordo com os resultados de estudos efetuados com adultos de *D. rerio* expostos a 0, 10 e 100 mg / L de perclorato, durante 6 semanas, em que este demonstrou ser um disruptor das funções da tiroide em peixe-zebra adulto. Isto deve-se a que a exposição prolongada de adultos de peixe zebra ao perclorato interrompe o funcionamento do eixo HPT e prejudica o desenvolvimento reprodutivo destes organismos (Mukhi and Patiño 2007).

Os efeitos foram evidentes para os dias 3, 7, 14 houve maior proporção de células nos estádios finais de desenvolvimento (Oca, Ov1, Ov 2 e células maduras) com uma maior proporção de células com níveis de desenvolvimento superiores nas concentrações 0 e 5 mg /L em relação às concentrações mais altas. Estas diferenças já não são tão evidentes aos 21 dias (Figura 17) com recuperação dos efeitos do HS mesmo com a transferência dos peixes para o meio limpo, acredita-se que esses efeitos ao contrário da tiroide, sejam decorrentes de uma bioacumulação do tóxico ao longo do tempo desenvolveram todos os estágios de maturação e mesmo com o período de 7 dias para recuperação não ovularam demonstrando os efeitos irreversíveis causados pela substância. Entre os grupos o estágio inicial de maturação correspondendo as oogónias referente ao tratamento 0 µg/l de HS foi dependente do tratamento indicando efeito nas gónadas femininas.

Muitos produtos químicos já foram considerados perturbadores do sistema endócrino, resultando em problemas de desenvolvimento e na reprodução (Harries et al. 2011). O HS é liberado no ambiente, acidental e intencionalmente, e a sua toxicidade foi descrita em embriões e adultos de *D. rerio* (Yosha and Cohen 1979), tendo-se revelado tóxico noutros organismos durante o período reprodutivo (Holbech et al. 2012). Não há estudos demonstrando os efeitos da toxicidade do HS nas gónadas de *D. rerio*.

Neste estudo o efeito do HS foi evidente nas gónadas das fêmeas. As gónadas femininas apresentaram alterações ao nível dos estágios de desenvolvimento embrionário em associação com a concentração de HS a que as fêmeas estiveram expostas. Os efeitos foram evidentes para os dias 3, 7, 14 onde houve menor proporção de células nos estádios finais de desenvolvimento (Oca, Ov1, Ov 2 e células maduras) com o aumento da concentração. Estas diferenças já não são tão evidentes no dia 21 onde, mesmo na concentração mais elevadas já se observam todos os tipos de células.

Um estudo feito em teleósteos mostram que o sucesso reprodutivo envolve uma interação entre as respostas comportamentais e fisiológicas que são controladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) e qualquer substância química que interfira com o controlo desses processos, em qualquer nível na hierarquia, é susceptível de afetar desempenho reprodutivo (Harries et al. 2011). Efeitos de disrupção endócrina em peixes incluem fertilidade reduzida e efeitos sobre o desenvolvimento das gónadas (Andersen et al. 2012). O atraso no desenvolvimento das gónadas pode estar relacionado com o nível de atividade da hormona de estimulação (GnRH) para secreção de GTH II (Okuzawa et al. 2003) importante para a maturação final dos ovócitos (Redding and Patiño 1993), e dopamina semelhante à hormona luteinizante (LH) em mamíferos (Redding and Patiño 1993). Quando há um aumento das hormonas gonadais no plasma, elas exercem um efeito inibitório sobre a liberação das GnRH, de maneira que haja oscilação. O oposto também ocorre, com a redução de hormonas gonadais no plasma há um aumento na produção de GnRH (Baldisserotto 2002; Redding and Patiño 1993). O GnRH estimula a liberação das gonadotrofinas pela hipófise enquanto que a dopamina inibe a libertação dessas gonadotrofinas, inibindo o efeito estimulante do GnRH, ocorre um aumento considerável do GTH II na corrente sanguínea, estimulada pela hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH), desse modo estimulando a maturação das gónadas, síntese e libertação de hormonas indutoras da maturação final e ovulação.

O atraso na maturação das gónadas pode ser o resultado de um efeito direto do HS sobre as gónadas ou resultar da ação indireta sobre outro componente do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

No presente estudo não houve resultados significativos nas gónadas masculinas. De acordo com outros estudos a exposição de compostos clorados mostrou não exercer qualquer efeito perceptível sobre a histologia do testículo (Leino et al. 2005), apesar de os níveis de testosterona no plasma terem diminuído significativamente. Isto significa que as diferentes concentrações de HS utilizadas não causaram alterações nas células de linhagem espermática quando comparadas com o grupo controle.

5. CONCLUSÕES

Estudos que investigam os efeitos causados na tiroide e no sistema reprodutivo de peixes e em outras espécies de animais são de grande importância para determinar o potencial de risco de um disruptor endócrino, avaliando efeitos no funcionamento (fisiologia), morfologia e as anomalias na glândula tiroide e na reprodução. Os resultados deste estudo indicam que a exposição ao HS:

- provoca efeitos nas células foliculares da tiroide (tirócitos) de *D. rerio*, nomeadamente, alterações na altura das células sugerindo alterações funcionais na atividade da tiroide indicativas de uma potencial disfunção endócrina causada pelo HS;

- provoca atrasos na maturação e desenvolvimentos dos oócitos, seja como resultado da ação direta do HS sobre os ovários seja como resultado de efeito sobre outros componentes do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal.

Além disso, análise histológica revelou-se uma ferramenta útil para detectar disfunção endócrina tanto ao nível da tiroide como dos ovários.

6. REFERÊNCIAS

- Abbas HH, Authman MM, Zaki MS, Mohamed GF. 2012. Effect of Seasonal Temperature Changes on Thyroid Structure and Hormones Secretion of White Grouper (*Epinephelus aeneus*) in Suez Gulf, Egypt. Life Science Journal 9(2):700-705.
- Abe T, Suzuki T, M. U, Tokui T, Ito S. 2002. Thyroid hormone transporters: recent advances. Trends in Endocrinology and Metabolism 13:215-220.
- Andersen L, Petersen GI, Gessbo Å, Stefan Ö, Holbech H, Bjerregaard P, Norrgren L. 2012. Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus rutilus*: Two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals? Aquatic Ecosystem Health and Management 4 275-282.
- Baldisserotto B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à Piscicultura. Santa Maria.
- Berghmans S, Butler P, Goldsmith P, Waldron G, Gardner I, Golder Z, Richards FM, Kimber G, Roach A, Alderton W and others. 2008. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function potential safety screens for early drug discovery. Pharmacol Toxicol Methods 58(1):59-68.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. 2002. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. Endocrine Reviews 23 (1):38-89.
- Bicho R. 2009. Efeito do cloro no desenvolvimento e na tiroide da Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*). Faro: Universidade do Algarve. 128 p.
- Bilsson K, Westerlund L, Tysklind M, Olsson PE. 1998. Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*). Marine Environmental Research 46:461-464.
- Block SS. 2001. Disinfection, sterilization, and preservation: Lippincott Williams & Wilkins.
- Brambilla A, Rindone B, Polesello S, Galassi S, Balestrini R. 1993. The rate of triazine pesticides in river po water. Science of Total Environment 132:339-348.
- Brucker-Davis F. 1998. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. Thyroid 8(9):827-856.
- Bulloch N, Lavado. D, K. RFL, Beni S, Schlenk., Larive KC. 2012. Analytical and Biological Characterization of Halogenated Gemfibrozil Produced through Chlorination of Wastewater. Environmental Science & Technology, 46:5583-5589.
- Bürgi H. 2010. Iodine excess. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 24(1):107-115.
- Capen CC. 2001. Toxic response of endocrine system. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6 ed. New York.

- Chan WK, Chan K. 2012. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo–larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquatic Toxicology* 108(0):106-111.
- Chang HJ. 1994. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride glutamate and switching osmolyte strategies. *The Political Economy of Industrial Policy*, London, Macmillan.
- Colborn T, Vom-Saal FS, Soto AM. 1993. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101:378-384.
- Cooke SJ, Schreer JF. 2001. Additive Effects of Chlorinated Biocides and Water Temperature on Fish in Thermal Effluents with Emphasis on the Great Lakes. *Reviews in Fisheries Science* 9(2):69-113.
- Dammski A, P MBR, Gaya CRD. 2011. Zebrafish Manual de criação em Biotério. 1 ed. p 02-105.
- Daston EP, Cook JC, Kavlock RJ. 2003. Uncertainties for Endocrine Disrupters: Our view on progress. *Toxicological Sciences* 74 245-252
- De Groef B, Van der Geyten S, Darras VM, Kühn ER. 2006. Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 146(1):62-68.
- Delange FM, Ermans AM. 1996. Iodine deficiency. In: Braverman RD, editor. *Werner and Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 7 ed. Philadelphia
- Delgado JBO, Ruane NM, Pousão-Ferreira P, Dinis MT, Sarasquete C. 2006. Thyroid gland development in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) during early life stages: A histochemical and immunohistochemical approach. *Aquaculture* 260(1–4):346-356.
- Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Rev.* 24(1):48-77.
- Eales JG. 2006. Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. In: Reinecke M, Zaccane G, Kapoor BG, editors. *Fish Endocrinology*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers. p 767-808.
- Eales JG, Brown SB. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in fish biology and fisheries* 3:299-347.
- EC. 2000 Reference document on the application of best available techniques to industrial cooling systems. Brussels: European IPPC Bureau. p 1–312.
- Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Orlie L, Ernest MW, Carrasco N. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter. *The Journal Of Biological Chemistry* 272(24):27230-27238.
- Fernandes E, Glória SMA, Guimarães AB. 2009. O setor de soda-cloro no Brasil e no mundo. *Petroquímica* 29:239-320.

- Fukushima AR, Azevedo AF. 2010. Pacto nacional da indústria química. ABIQUIM
- Ganeco LN. 2007. Ontogenia da resposta endócrina em larvas de matrinxã *Brycon amazonicus* - Ênfase nos eixos Hipófise-tireóide e Hipófise-tecido interrenal. Brasil: São Paulo.
- García- Ayala A, Villaplana M, García-Hernández MP, Chaves Pozo E, Agulleiro B. 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study. General and Comparative Endocrinology 134 72- 79.
- Grau H, Walter P. 1975. Histología y anatomia microscópica comparada de los mamíferos domésticos. Barcelona: Labor.
- Gundersen HJG, Bendtsen LK, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkrnberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. 1998. Some New, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis APMIS 96(5):379-394.
- Hadley ME. 2000. Endocrinology. Upper Saddle River: Princet Hall.
- Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harries CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2011. Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol. 34(14):3003-3011.
- Hidalgo E, Dominguez C. 2000. Growth-altering Effects of Sodium Hypochlorite in Cultured Human Dermal Fibroblasts. Life Science 67:1331-1344.
- Holbech H, Kinnberg KL, Brande-Lavridsen N, Bjerregaard P, Petersen GI, Norrgren L, Örn S, Braunbeck T, Baumann L, Bomke C and others. 2012. Comparison of zebrafish (*Danio rerio*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) as test species in the Fish Sexual Development Test (FSDT). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 155(2):407-415.
- Janssen PAH, Lambert JGD, Vethaak AD, Goos HJT. 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.). Aquatic Toxicology 39(3-4):195-214.
- Jenkins J. 2000. The Humanure Handbook: A Guide to Composting Human Manure. 3rd ed. USA: Chelsea Green
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology 32 2498-2506.
- Johnson R, Wolf J, Braunbeck T. 2009. OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico ou Económico (OCDE):2-96.
- Jugan M-L, Levi Y, Blondeau J-P. 2010. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. Biochemical Pharmacology 79(7):939-947.

- Junqueira LC, Carneiro J. 2004. Histologia Básica. Brasil: Guanabara Koogan S.A. 453 p.
- Klaren PHM, Wunderink YS, Yúfera M, Mancera JM, Flik G. 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. General and Comparative Endocrinology 155(3):686-694.
- Kleijn R, van der Voet E. 1998. Chlorine in Western Europe - A MacTempo Case study: Summary Report. Leiden University, NL: Centre for Environmental Science (CML).
- Kopp P, Pesce L, Solis-S JC. 2008. Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. Trends in Endocrinology & Metabolism 19(7):260-268.
- Kostamo A, Holmbom B, Kukkonen JVK. 2004. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. Water Research 38:972-982.
- Langford TEL. 1990. Ecological Effects of Thermal Discharges. Elsevier Applied Science Publis.
- Leatherland JF, Ferguson HW. 1997. Endocrine and Reproductive Systems. In: Ferguson HW, editor. Systemic Pathology of fish. A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of teleost. USA: Iowa State University Press. p 195-214.
- Leino RL, Jensen KM, Ankley GT. 2005. Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*) Environmental Toxicology and Pharmacology 19(1):85-98.
- Liu F, Gentles A, Theodorakis CW. 2008. Arsenate and perchlorate toxicity, growth effects, and thyroid histopathology in hypothyroid zebrafish *Danio rerio*. Chemosphere 71(7):1369-1376.
- López-Galindo C, Vargas-Chacoff L, Nebot E, Casanueva JF, Rubio D, Solé M, Mancera JM. 2010. Biomarker responses in *Solea senegalensis* exposed to sodium hypochlorite used as antifouling. Chemosphere 78(7):885-893.
- Markley CM, Rubin BS, Soto AM, Sonnenschein C. 2003. Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology. Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology 83:235-244
- McNabb FMA, Jang DA, Larsen CT. 2004. Does Thyroid Function in Developing Birds Adapt to Sustained Ammonium Perchlorate Exposure? Toxicological Sciences 82:106-113.
- Menke AL, Spitsbergen MJ, Wolterbeek MPA, Woutersen AR. 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. Toxicology Pathology:4.
- Middaugh DP, Crane AM, Couch JA. 1977. Toxicity of chlorine to juvenile spot, *Leiostomus xanthurus*. Water Research 11(12):1089-1096.

- Miot F, Dupuy C, Dumont J. 2010. Thyroid Hormone Synthesis and Secretion. Thyroid Disease Manager. <http://www.thyroidmanager.org/>.
- Moore TI, Wingfield CJ, Brenowitz AE. 2004. Plasticity of the Avian Song Control System in Response to Localized Environmental Cues in an Equatorial Songbird. *The Journal of Neuroscience* 24(25):10182-10185.
- Mukhi S, Patiño R. 2007. Effects of Prolonged Exposure to Perchlorate on Thyroid and Reproductive Function in Zebrafish. *Toxicological Sciences* 96(2):246-254.
- Nimkerdphol K, Nakagawa M. 2008. Effect of sodium hypochlorite on zebrafish swimming behavior estimated by fractal dimension analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105(5):486-492.
- Okuzawa K, Naoki K, Koichiro G, Sonoko Y, Bong-Soo L, Hirohiko K. 2003. Effect of high water temperature on brain-pituitary-gonad axis of the red seabream during its spawning season. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:439-440.
- Owens JW. 1991. The hazard assessment of the pulp and paper effluents in the aquatic environment: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 10:1511-1540.
- Phillips ML, Spotts S. 1995. Chlorine and Chloramine Analysis Methods. *Water Technology Magazine*.
<https://secure.gvmg.com/watertechnonline/article.asp?IndexID=5181102>.
- Power DM, Elias NP, Richardson SJ, Mendes J, Soares CM, Santos CRA. 2000. Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology* 119(3):241-255.
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson BT, Einarsson IE, Canario AVM, Sweeney GE. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish (síntese dos hormônios). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4):447-459.
- Raldúa D, Thienpont B, Babin PJ. 2012. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reproductive Toxicology* 33(2):188-197.
- Ramos P, Peleteiro CM. 2001. Hiperplasia da Tireoide em *Serranus hepatus* *Revista Portuguesa* 207-2012.
- Rand GM, Wells PG, McCarty LS. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand GM, editor. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Washington: Taylor & Francis. p 3-67.
- Redding JM, Patiño R. 1993. Reproductive physiology. In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Washington: Taylor & Francis. p 503-534.
- Reys LL. 2001. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. *Grupo de Medicina Preventiva e Ciências Sociais, Faculdade de Medicina de Lisboa*. 3 213-225.

- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumper JP. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ. Sci. Technol* 32:1559-1565.
- Santos F. 2009. Tiroide e paratiroide - Diagnóstico Laboratorial. Porto: Universidade do Porto. 59 p.
- Santos JCE. 2004. Indução à ovulação de curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* agassiz (1829): Comparação entre duas técnicas de hipofiseção. Brasil: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 50 p.
- Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, Canistro D, Broccoli M, Pozzetti L, Affatato A, Valgimigli L, Forti GC, Pedulli GF and others. 2007. Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to potable surface water. *Mutation Research* 626(1-2):143-154.
- Segner H. 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149(2):187-195.
- Soares CHL. 2000. Estudo Comparativo da Toxicidade de Efluentes de Indústria de Papel e Celulose Utilizando Parâmetros Bioquímicos em Ecotoxicologia. In: Espíndola ELG, Paschoal CMRB, Rocha O, Bohrer MBC, Neto ALO, editors. *Ecotoxicologia - Perspectivas Para o Século XXI* São Carlos, SP: Rima Editora
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83(1):13-34.
- Stevens A, James SL. 1997. *Human Histology*. London.
- Strete D. 1995. *A color Atlas of Histology*. NY, USA. p 213.
- Takashima F, Hibiya T. 1995. *An atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*. Tokyo: Lubrecht & Cramer Ltd. p 154.
- Taylor CJL. 2006. The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations. *Mar. Poll. Bull.* 53:30-48.
- USEPA. 2002. Fish screening assays for endocrine disruption.
- Verma AK, Pal AK, Manush SM, Das T, Dalvi RS, Chandrachoodan PP, Ravi PM, Apte SK. 2007. Persistent sub-lethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87(3):229-237.
- Volkoff HJP, Wourms EA, Snelson FF. 1999. Structure of the thyroid gland, serum thyroid hormones, and the reproductive cycle of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Journal of Experimental Biology* 284(5):505-516.
- Vos JG. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol* 30:71-133.
- Winder C. 2001. The toxicology of chlorine. *Environmental Research* 85:105-114.

- Yonkos LT, Fisher DJ, Wright DA, Kane AS. 2000. Pathology of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to chlorine dioxide and chlorite. *Marine Environmental Research* 50(1-5):267-271.
- Yosha SF, Cohen GM. 1979. Effect of intermittent chlorination on developing zebrafish embryos (*Branchydanio rerio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 21:703-710.